

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 0 7 D 401/12		C 0 7 D 401/12	
A 6 1 K 31/475		A 6 1 K 31/475	
31/496		31/496	
31/5355		31/5355	
31/5377		31/5377	
審査請求 有 請求項の数10 O L (全 25 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願2001-61661(P2001-61661)	(71) 出願人	397067152 ファイザー・プロダクツ・インク アメリカ合衆国コネチカット州グロトン市 イースタン・ポイント・ロード
(22) 出願日	平成13年3月6日(2001.3.6)	(72) 発明者	ジョイス・アン・サトリフ アメリカ合衆国コネチカット州06340, グ ロトン, イースタン・ポイント・ロード, ファイザー・グローバル・リサーチ・アン ド・ディベロプメント
(31) 優先権主張番号	6 0 / 1 8 7 6 0 5	(74) 代理人	100089705 弁理士 社本 一夫 (外5名)
(32) 優先日	平成12年3月7日(2000.3.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
最終頁に続く			

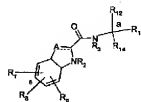
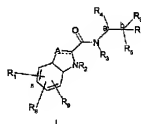
(54) 【発明の名称】 感染症を処置するためのヘテロアリール置換されたN- (インドール-2-カルボニル) アミ

(57) 【要約】 ド類の使用

【課題】 感染症、例えば、細菌性、真菌性、寄生生物性またはウイルス性感染症を治療または予防するための方法および医薬組成物を提供することである。

【解決手段】 本明細書で定義する式 I または 1 A :

【化 1】

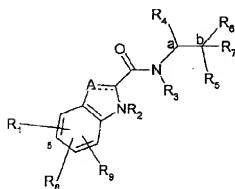


で表されるグリコゲンホスホリラーゼ阻害剤を含有する医薬組成物を、上記感染症を治療するために、哺乳動物に投与する。

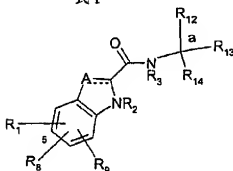
【特許請求の範囲】

【請求項1】 式Iまたは式I A:

【化1】



式I



式I A

〔式中、点線(――)は、任意の結合であり; Aは、点線(――)が結合である時に、 $-C(H)=$; $-C((C_1-C_4) \text{ アルキル})=$ または $-C(\text{ハロ})=$ であり; Aは、点線(――)が結合でない時に、メチレンまたは $-CH((C_1-C_4) \text{ アルキル})-$ であり; R_1 , R_5 または R_6 は、各々、独立に、H; ハロ; 4- $-$, 6-もしくは7-ニトロ; シアノ; (C_1-C_4) アルキル; (C_1-C_4) アルコキシ; フルオロメチル; ジフルオロメチルまたはトリフルオロメチルであり; R_2 は、Hであり; R_3 は、Hまたは (C_1-C_6) アルキルであり; R_4 は、H; メチル; エチル; n-プロピル; ヒドロキシ (C_1-C_3) アルキル; (C_1-C_3) アルコキシ (C_1-C_3) アルキル; フェニル (C_1-C_4) アルキル; フェニルヒドロキシ (C_1-C_4) アルキル; フェニル (C_1-C_4) アルコキシ (C_1-C_4) アルキル; チエン-2-もしくは-3-イル (C_1-C_4) アルキルまたはフル-2-もしくは-3-イル (C_1-C_4) アルキルであり; 前記 R_4 環は、炭素上を、H; ハロ; (C_1-C_4) アルキル; (C_1-C_4) アルコキシ; トリフルオロメチル; ヒドロキシ; アミノまたはシアノで、独立に、――、二-または三-置換されているか; または、 R_4 は、ピリド-2-, -3-もしくは-4-イル (C_1-C_4) アルキル; チアゾール-2-, -4-もしくは-

-5-イル (C_1-C_4) アルキル; イミダゾール-1-, -2-, -4-もしくは-5-イル (C_1-C_4) アルキル; ピロリル-2-もしくは-3-イル (C_1-C_4) アルキル; オキサゾール-2-, -4-もしくは-5-イル (C_1-C_4) アルキル; ピラゾール-3-, -4-もしくは-5-イル (C_1-C_4) アルキル; イソオキサゾール-3-, -4-もしくは-5-イル (C_1-C_4) アルキル; イソチアゾール-3-, -4-もしくは-5-イル (C_1-C_4) アルキル; ピリダジン-3-もしくは-4-イル (C_1-C_4) アルキル; ビリミジン-2-, -4-, -5-もしくは-6-イル (C_1-C_4) アルキル; ピラジン-2-もしくは-3-イル (C_1-C_4) アルキルまたは1, 3, 5-トリアジン-2-イル (C_1-C_4) アルキルであり; 前記 R_4 ヘテロ環は、所望により、ハロ; トリフルオロメチル; (C_1-C_4) アルキル; (C_1-C_4) アルコキシ; アミノまたはヒドロキシで、独立に、――または二-置換されており、前記――または二-置換基は、炭素に結合されており; R_5 は、H; ヒドロキシ; フッ素; (C_1-C_6) アルキル; (C_1-C_6) アルコキシ; (C_1-C_6) アルカノイル; アミノ (C_1-C_4) アルコキシ; モノ-N-もしくはジ-N, N- (C_1-C_4) アルキルアミノ (C_1-C_4) アルコキシ; カルボキシ (C_1-C_4) アルコキシ; (C_1-C_6) アルコキシカルボニル (C_1-C_4) アルコキシ; ベンジルオキシカルボニル (C_1-C_4) アルコキシまたはカルボニルオキシであり; 前記カルボニルオキシは、フェニル; チアゾリル; イミダゾリル; 1-H-インドリル; フリル; ピロリル; オキサゾリル; ピラゾリル; イソオキサゾリル; イソチアゾリル; ピリダジニル; ビリミジニル; ピラジニルまたは1, 3, 5-トリアジニルと炭素-炭素結合し、前記 R_5 環は、所望により、ハロ; (C_1-C_4) アルキル; (C_1-C_4) アルコキシ; ヒドロキシ; アミノまたはトリフルオロメチルで――置換されており、前記――置換基は、炭素に結合されており; R_7 は、H; フッ素または (C_1-C_6) アルキルであるか; または、 R_6 および R_7 は、相互に含さず、オキソであってもよく; R_6 は、C(O) R_{10} であり; R_{10} は、ビペラジン-1-イル; 4- (C_1-C_4) アルキルビペラジン-1-イル; 4-ホルミルビペラジン-1-イル; モルホリノ; チオモルホリノ; 1-オキソチオモルホリノ; 1, 1-ジオキソチオモルホリノ; チアゾリジン-3-イル; 1-オキソチアゾリジン-3-イル; 1, 1-ジオキソチアゾリジン-3-イル; 2- (C_1-C_6) アルコキシカルボニルピロリジン-1-イル; オキサゾリジン-3-イルまたは2(R)-ヒドロキシメチルピロリジン-1-イルであるか; または、 R_{10} は、3-および/または4-――または二-置換されたオキサゼチジン-2-イル; 2-, 4-, および/または5-――置換または二-置換されたオキサゾリ

ジーン-3-イル；2-， 4-， および／または5-
または二置換されたチアゾリジン-3-イル；2-，
4-， および／または5-
または二置換された1-
オキソチアゾリジン-3-イル；2-， 4-， および
／または5-
または二置換された1， 1-ジオキ
ソチアゾリジン-3-イル；3-および／または4-，
-
または二置換されたピロリジン-1-イル；3-
， 4-および／または5-， -， -
または二置換されたピペラジ
ン-1-イル；3-置換されたアゼチジン-1-イル；4-
-および／または5-， -
または二置換された1，
2-オキサジナン-2-イル；3-および／または4-
-
または二置換されたピラジリン-1-イル；4-
-および／または5-， -
または二置換されたイソ
オキサゾリジン-2-イル；4-および／または5-，
-
および／または二置換されたイソチアゾリジン-
2-イルであり；前記R₁₀置換基は、独立に、H；ハ
ロ；(C₁-C₆) アルキル；ヒドロキシ；アミノ，モ
ノ-N-もしくはジ-N，N-(C₁-C₈) アルキルア
ミノ；ホルミル；オキソ；ヒドロキシイミノ；(C₁-
C₆) アルコキシ；カルボキシ；カルバモイル；モノ-
Nまたはジ-N，N-(C₁-C₄) アルキルカルバモイ
ル；(C₁-C₄) アルコキシイミノ；(C₁-C₄) アル
コキシメトキシ；(C₁-C₆) アルコシカルボニル；
カルボキシ(C₁-C₆) アルキルまたはヒドロキシ(C₁-
C₆) アルキルであり；R₁₂は、H；メチル；エチ
ル；n-プロピル；ヒドロキシ(C₁-C₃) アルキル；
(C₁-C₃) アルコキシ(C₁-C₃) アルキル；フェニ
ル(C₁-C₄) アルキル；フェニルヒドロキシ(C₁-
C₄) アルキル；(フェニル)(C₁-C₄)-アルコ
キシ(C₁-C₄) アルキル；チエン-2-もしくは-3-
-イル(C₁-C₄) アルキルまたはフル-2-もしくは-
3-イル(C₁-C₄) アルキルであり；前記R₁₆環
は、炭素上を、H；ハロ；(C₁-C₄) アルキル；(C₁-
C₄) アルコキシ；トリフルオロメチル；ヒドロキ
シ；アミノ；シアノまたは4， 5-ジヒドロ-1H-イ
ミダゾール-2-イルで、独立に、-， -
または三
置換されているか；または、
R₁₂は、ビリド-2-， -3-もしくは-4-イル(C₁-
C₄) アルキル；チアゾール-2-， -4-もしくは-
5-イル(C₁-C₄) アルキル；イミダゾール-2-
， -4-もしくは-5-イル(C₁-C₄) アルキル；
ピロール-2-もしくは-3-イル(C₁-C₄) アルキ
ル；オキサゾール-2-， -4-もしくは-5-イル
(C₁-C₄) アルキル；ピラゾール-3-， -4-もし
くは-5-イル(C₁-C₄) アルキル；イソオキサゾ
ール-3-， -4-もしくは-5-イル(C₁-C₄) アル
キル；イソチアゾール-3-， -4-もしくは-5-イ
ル(C₁-C₄) アルキル；ピリジン-3-もしくは-

4-イル(C₁-C₄) アルキル；ピリミジン-2-，
-4-， -5-もしくは-6-イル(C₁-C₄) アルキ
ル；ピラジン-2-もしくは-3-イル(C₁-C₄) アル
キル；1， 3， 5-トリアジン-2-イル(C₁-
C₄) アルキルまたはインドール-2- (C₁-C₄) アル
キルであり；前記R₁₂ヘテロ環は、所望により、ハ
ロ；トリフルオロメチル；(C₁-C₄) アルキル；(C₁-
C₄) アルコキシ；アミノ；ヒドロキシまたはシアノ
で、独立に、-
または二置換されてお
り、前記置換
基は、炭素に結合されているか；または、
R₁₂は、R₁₁-カルボニルオキシメチルであり；前記R₁₁
は、フェニル；チアゾリル；イミダゾリル；1H-イ
ンドリル；フリル；ピロリル；オキサゾリル；ピラゾ
リル；イソオキサゾリル；イソチアゾリル；ピリジ
ル；ピリダジニル；ピリミジニル；ピラジニルまたは1， 3，
5-トリアジニルであり；前記R₁₁環は、所望により、
ハロ；アミノ；ヒドロキシ；(C₁-C₄) アルキル；
(C₁-C₄) アルコキシまたはトリフルオロメチルで、
独立に、-
または二置換されてお
り、前記-
または二置換基は、炭素に結合されており、R₁₃は、H；
メチル；エチル；n-プロピル；ヒドロキシメチルま
はヒドロキシエチルであり；R₁₄C(O)；R₁₅あり；
R₁₆は、モルホリノ；チオモルホリノ；1-オキソチオ
モルホリノ；1， 1-ジオキソチオモルホリノ；チア
ゾリジン-3-イル；1-オキソチアゾリジン-3-イ
ル；1， 1-ジオキソチアゾリジン-3-イル；ピロリ
ジン-1-イル；ピペリジン-1-イル；ピペラジ
ン-1-イル；ピペラジン-4-イル；アゼチジン-1-イ
ル；1， 2-オキサジナン-2-イル；ピラジリン-
1-イル；イソオキサゾリジン-2-イル；イソチア
ゾリジン-2-イル；1， 2-オキサアゼチジン-2-イ
ル；オキサゾリジン-3-イル；3， 4-ジヒドロキ
イソキノリン-2-イル；1， 3-ジヒドロイソキノ
リン-2-イル；3， 4-ジヒドロ-2H-キノリン-1-
イル；2， 3-ジヒドロベンゾ [1， 4] オキサジ
ン-4-イル；2， 3-ジヒドロベンゾ [1， 4] -チ
アジン-4-イル；3， 4-ジヒドロ-2H-キナキ
サリン-1-イル；3， 4-ジヒドロベンゾ [c]
[1， 2] オキサジン-1-イル；1， 4-ジヒドロ
ベンゾ [d] [1， 2] オキサジン-3-イル；3， 4-
ジヒドロベンゾ [e] [1， 2] -オキサジン-2-
イル；3H-ベンゾ [d] イソオキサゾール-2-イ
ル；3H-ベンゾ [c] イソオキサゾール-1-イルま
たはアゼパイン-1-イルであり；前記R₁₆環は、所望
により、ハロ；(C₁-C₆) アルキル；(C₁-C₆) アル
コキシ；ヒドロキシ；アミノ；モノ-N-もしくはジ-
N，N-(C₁-C₆) アルキルアミノ；ホルミル；カル
ボキシ；カルバモイル；モノ-N-もしくはジ-N，N-
(C₁-C₆) アルキルカルバモイル；(C₁-C₆) アル
コキシ(C₁-C₆) アルコキシ；(C₁-C₆) アルコ

キシカルボニル；ベンジルオキシカルボニル；(C₁—C₆) アルコキシカルボニル (C₁—C₆) アルキル；(C₁—C₄) アルコキシカルボニルアミノ；カルボキシ(C₁—C₆) アルキル；カルバモイル(C₁—C₆) アルキル；モノ—N—もしくはジ—N, N—(C₁—C₆) アルキルカルバモイル(C₁—C₆) アルキル；ヒドロキシ(C₁—C₆) アルキル；(C₁—C₄) アルコキシ(C₁—C₄) アルキル；アミノ(C₁—C₄) アルキル；モノ—N—もしくはジ—N, N—(C₁—C₄) アルキルアミノ(C₁—C₄) アルキル；オキソ；ヒドロキシミノまたは(C₁—C₆) アルコキシミノで、独立に、一、二または三—置換されており；ほんの2つの置換基は、オキソ；ヒドロキシミノまたは(C₁—C₆) アルコキシミノから選択され、オキソ；ヒドロキシミノまたは(C₁—C₆) アルコキシミノは、非芳香族性炭素上にあり；前記R₁₅環は、所望により、さらに、(C₁—C₆) アルキルまたはハロで、独立に、一または二—置換されている。〕で表される化合物；および、その薬学的に許容可能な塩類およびプロドラッグの有効な量を投与することを含む哺乳動物における感染症を処置する方法。

【請求項2】 前記感染症が、細菌性、真菌性、寄生生物性またはウイルス性感染症であり、化合物が、R₁が、5—H, 5—ハロ, 5—メチルまたは5—シアノであり；R₆およびR₉が、各々、独立に、Hまたはハロであり；Aが、—C(H)—であり；R₂およびR₃が、Hであり；R₄が、フェニル(C₁—C₆) アルキルであり；前記フェニル基が、Hまたはハロで、独立に、一、二または三—置換されているか、または、H；ハロ；(C₁—C₄) アルキル；(C₁—C₄) アルコキシ；トリフルオロメチル；ヒドロキシ；アミノまたはシアノで、独立に、一または二—置換されているか；または、R₄が、チエン—2—もしくは—3—イル(C₁—C₂) アルキル；ピリド—2—, —3—もしくは—4—イル(C₁—C₂) アルキル；チアゾール—2—, —4—もしくは—5—イル(C₁—C₂) アルキル；イミダゾール—1—, —2—, —4—もしくは—5—イル(C₁—C₂) アルキル；フル—2—もしくは—3—イル(C₁—C₂) アルキル；ピロール—2—もしくは—3—イル(C₁—C₂) アルキル；オキサゾール—2—, —4—もしくは—5—イル(C₁—C₂) アルキル；ピラゾール—3—, —4—もしくは—5—イル(C₁—C₂) アルキル；イソオキサゾール—3—, —4—もしくは—5—イル(C₁—C₂) アルキルであり；前記R₄ヘテロ環が、所望により、ハロ；トリフルオロメチル；(C₁—C₄) アルキル；(C₁—C₄) アルコキシ；アミノまたはヒドロキシで、独立に、一または二—置換され、前記一または二—置換基が炭素に結合されており；R₆が、ヒドロキシであり；R₇が、Hである；式Iで表される、請求項

1に記載の方法。

【請求項3】 aと標識された炭素原子が、(S)立体化学を有し；bと標識された炭素原子が、(R)立体化学を有し；R₄が、フェニル(C₁—C₂) アルキル；チエン—2—イル(C₁—C₂) アルキル；チエン—3—イル(C₁—C₂) アルキル；フル—2—イル(C₁—C₂) アルキルまたはフル—3—イル(C₁—C₂) アルキルであり；前記環が、Hまたはフッ素で、独立に、一または二—置換されており；R₁₀が、ホルホルノ；4—(C₁—C₄) アルキルピラジーン—1—イル；3—置換されたアゼチジン—1—イル；3—および/または4—, 一または二—置換されたピロリジン—1—イル；4—および/または5—一または二—置換されたイソオキサゾリン—2—イル；4—および/または5—, 一または二—置換された1, 2—オキサジナン—2—イルであり；前記置換基が、各々、独立に、H；ハロ；ヒドロキシ；アミノ；モノ—N—もしくはジ—N, N—(C₁—C₆) アルキルアミノ；オキソ；ヒドロキシミノまたはアルコキシである、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 化合物が、式Iで表され；かつ、式中、R₁が、H；ハロ；メチルまたはシアノであり；R₆およびR₉が、各々、独立に、Hまたはハロであり；Aが、—C(H)—であり；R₂およびR₃が、Hであり；R₄が、フェニル(C₁—C₂) アルキルであり；前記フェニル基が、Hまたはハロで、一、二または三—置換されているか、または、H；ハロ；(C₁—C₄) アルキル；(C₁—C₄) アルコキシ；トリフルオロメチル；ヒドロキシ；アミノまたはシアノで、独立に、一または二—置換されているか；または、R₄が、チエン—2—もしくは—3—イル(C₁—C₂) アルキル；ピリド—2—, —3—もしくは—4—イル(C₁—C₂) アルキル；チアゾール—2—, —4—もしくは—5—イル(C₁—C₂) アルキル；イミダゾール—1—, —2—, —4—もしくは—5—イル(C₁—C₂) アルキル；フル—2—もしくは—3—イル(C₁—C₂) アルキル；ピロール—2—もしくは—3—イル(C₁—C₂) アルキル；オキサゾール—2—, —4—もしくは—5—イル(C₁—C₂) アルキル；ピラゾール—3—, —4—もしくは—5—イル(C₁—C₂) アルキル；イソオキサゾール—3—, —4—もしくは—5—イル(C₁—C₂) アルキルであり；前記R₄ヘテロ環が、所望により、ハロ；トリフルオロメチル；(C₁—C₄) アルキル；(C₁—C₄) アルコキシ；アミノまたはヒドロキシで、独立に、一または二—置換され、前記一または二—置換基が炭素に結合されており；R₅が、フッ素；(C₁—C₄) アルキル；(C₁—C₆) アルコキシ；アミノ(C₁—C₄) アルコキシ；モノ—N—もしくはジ—N, N—(C₁—C₄) アルキルアミノ(C₁—C₄) アルコキシ；カルボキシ(C₁—C₄) アルコキシ；(C₁—

－1－イル）－2－オキソ－エチル）－アミド；5－クロロ－1H－インドール－2－カルボン酸〔（1S）－ベンジル－2－（3－ヒドロキシ－アゼチン－1－イル）－2－オキソ－エチル）－アミド；5－クロロ－1H－インドール－2－カルボン酸〔（1S）－ベンジル－2－（3－ヒドロキシミノアゼチン－1－イル）－2－オキソ－エチル）－アミド；5－クロロ－1H－インドール－2－カルボン酸〔（1S）－ベンジル－2－（4－ヒドロキシミノピペリジン－1－イル）－2－オキソ－エチル）－アミド；および、5－クロロ－1H－インドール－2－カルボン酸〔1－ベンジル－2－（3－ヒドロキシピロリジン－1－イル）－2－オキソ－エチル）アミドからなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項8】哺乳動物における感染症を処置するための医薬組成物であって、前記感染症を処置するために有効な量の式IまたはIAで表される化合物；または、その薬学的に許容可能な塩またはプロドラッグを薬学的に許容可能な担体と組合せて含む医薬組成物。

【請求項9】哺乳動物におけるクラミジアニューモニエ（*Chlamydia pneumoniae*）感染症を処置する方法であって、前記感染症を処置するのに有効な量のグリコゲンホスホリラーゼ阻害剤を投与することを含む方法。

【請求項10】哺乳動物におけるクラミジアニューモニエ（*Chlamydia pneumoniae*）感染症を処置するための医薬組成物であって、前記感染症を処置するのに有効な量のグリコゲンホスホリラーゼ阻害剤を薬学的に許容可能な担体と組合せて含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、感染症の処置におけるある種のグリコゲンホスホリラーゼ阻害剤の使用に関する。

【0002】

【従来の技術】組織におけるグリコゲノリシスは、それによって、グリコゲンを開裂させて、グルコース－1－ホスフェートを放出するが、グリコゲンホスホリラーゼ（GP）によって触媒される。ヒトにおいて、この酵素の3つのイソフォーム（isofoms）、すなわち、肝臓イソフォーム（HLGP）、筋肉イソフォーム（HMG P）および脳イソフォーム（HBGP）が同定されている。これらイソフォームは、3つの別個の遺伝子生成物であり、80－83%のアミノ酸同一性を有する（C. B. Newgard, D. R. Littman, C. van Gendered, M. Smith, and R. J. Fletterick, J. Biol. Chem. 263:3850－3857, 1988）。グリコゲンホスホリラー

ゼは、また、細菌中にも存在する。

【0003】今日までに報告されているグリコゲンホスホリラーゼ阻害剤としては、グルコースおよびグルコース類縁体が挙げられる（例えば、Martin, J. L. et al., Biochemistry 1991, 30, 10101）、カフェインおよびその他のプリン類縁体が挙げられる（例えば、Kasvinsky, P. J. et al., Biol. Chem. 1978, 253, 3343－3351 and 9102－9106）、このタイプの阻害剤は、Oikonomakos, N. G. et al., Protein Sci. 1999, 8, 1930－1945に記載されている。

【0004】グリコゲンホスホリラーゼ阻害剤は、真性糖尿病の処置に有用である。例えば、国際特許公開公報WO 96/39383およびWO 96/39385は、両方とも、1996年12月12日に公開され、糖尿病を処置するための置換されたN－（インドール－2－カルボニル）アミド類および誘導体の使用を記載している。これら化合物は、また、アテローム性動脈硬化症、高インスリン血症、高コレステロール血症、高血圧症、高脂血症の治療および心筋虚血損傷の予防に有用であると記載されている。

【0005】米国特許5,952,322は、非心臓性虚血を伴う組織損傷を軽減するために、例えば、WO 96/39384およびWO 96/39385に記載されているもののようなグリコゲンホスホリラーゼ阻害剤の使用を記載している。

【0006】1999年3月16日に発行された米国特許5,882,885は、中耳炎、結膜炎、肺炎、菌血症、髄膜炎、静脈炎、胸膜蓄膿症および心内膜炎の処置において有用なストレプトコッカスグリコゲンホスホリラーゼのアンタゴニストおよびアゴニストに関する。

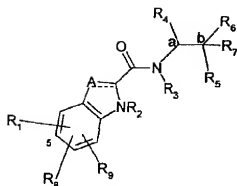
【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、感染症、例えば、細菌性、真菌性、寄生生物性またはウイルス性感染症を治療または予防する方法であって、前記感染症の治療および予防に有効な式Iまたは式IAで表される化合物の量を投与することを含む方法に係る。

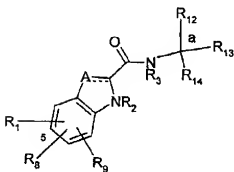
【0008】式Iまたは式IAで表される化合物は、構造式：

【0009】

【化2】



式 I



〔式中、点線（――）は、~~式 I~~ A 意の結合であり；Aは、点線（――）が結合である時に、 $-C(H)=$ ； $-C(C_1-C_4)$ アルキル）=または $-C(H)$ ）=であり；Aは、点線（――）が結合でない時に、メチレンまたは $-CH(C_1-C_4)$ アルキル）=であり； R_1, R_9 または R_{10} は、各々、独立に、H；ハロ；4-、6-もしくは7-ニトロ；シアノ； (C_1-C_4) アルキル； (C_1-C_4) アルコキシ；フルオロメチル；ジフルオロメチルまたはトリフルオロメチルであり； R_2 は、Hであり； R_3 は、Hまたは (C_1-C_6) アルキルであり； R_4 は、H；メチル；エチル；n-プロピル；ヒドロキシ (C_1-C_3) アルキル； (C_1-C_3) アルコキシ (C_1-C_3) アルキル；フェニル (C_1-C_4) アルキル；フェニルヒドロキシ (C_1-C_4) アルキル；フェニル (C_1-C_4) アルコキシ (C_1-C_4) アルキル；チエン-2-もしくは-3-イル (C_1-C_4) アルキルまたはフル-2-もしくは-3-イル (C_1-C_4) アルキルであり；前記 R_5 環は、炭素上を、H；ハロ； (C_1-C_4) アルキル； (C_1-C_4) アルコキシ；トリフルオロメチル；ヒドロキシ；アミノまたはシアノで、独立に、――、二―または三―置換されているか；または、 R_4 は、ピリド-2-、-3-もしくは-4-イル (C_1-C_4) アルキル；チアゾール-2-、-4-もしくは-5-イル (C_1-C_4) アルキル；イミダゾール-1-、-2-、-4-もしくは-5-イル (C_1-C_4) ア

ルキル；ピロール-2-もしくは-3-イル (C_1-C_4) アルキル；オキサゾール-2-、-4-もしくは-5-イル (C_1-C_4) アルキル；ピラゾール-3-、-4-もしくは-5-イル (C_1-C_4) アルキル；インオキサゾール-3-、-4-もしくは-5-イル (C_1-C_4) アルキル；インチアゾール-3-、-4-もしくは-5-イル (C_1-C_4) アルキル；ピリダジン-3-もしくは-4-イル (C_1-C_4) アルキル；ピリミジン-2-、-4-、-5-もしくは-6-イル (C_1-C_4) アルキル；ピラジン-2-もしくは-3-イル (C_1-C_4) アルキルまたは1, 3, 5-トリアジン-2-イル (C_1-C_4) アルキルであり；前記 R_6 環は、所望により、ハロ；トリフルオロメチル； (C_1-C_4) アルキル； (C_1-C_4) アルコキシ；アミノまたはヒドロキシで、独立に、――または二―置換されており、前記――または二―置換基は、炭素に結合されており； R_6 は、H；ヒドロキシ；フッ素； (C_1-C_6) アルキル； (C_1-C_6) アルコキシ； (C_1-C_6) アルカノイル；アミノ (C_1-C_4) アルコキシ；モノ-N-もしくはジ-N, N- (C_1-C_4) アルカノイル (C_1-C_4) アルコキシ；カルボキシ (C_1-C_4) アルコキシ； (C_1-C_6) アルコキシ-カルボニル (C_1-C_4) アルコキシ；ベンジルオキシカルボニル (C_1-C_4) アルコキシまたはカルボニルオキシであり；前記カルボニルオキシは、フェニル；チアゾリル；イミダゾリル；1-H-インドリル；フリル；ピロリル；オキサゾリル；ピラゾリル；イソオキサゾリル；イソチアゾリル；ピリダジニル；ピリミジニル；ピラジニルまたは1, 3, 5-トリアジニルと炭素-炭素結合し、前記 R_6 環は、所望により、ハロ； (C_1-C_4) アルキル； (C_1-C_4) アルコキシ；ヒドロキシ；アミノまたはトリフルオロメチルで――置換されており、前記――置換基は、炭素に結合されており； R_7 は、H；フッ素または (C_1-C_6) アルキルであるか；または、 R_6 および R_7 は、相互に合さって、オキソであってもよく； R_8 は、C(O) R_{10} であり； R_{10} は、ビペラジン-1-イル；4- (C_1-C_4) アルキルビペラジン-1-イル；4-ホルミルビペラジン-1-イル；ホルホルノ；チオホルホルノ；1-オキソチオホルホルノ；1, 1-ジオキソチオホルホルノ；チアゾリジン-3-イル；1-オキソチアゾリジン-3-イル；1, 1-ジオキソチアゾリジン-3-イル；2- (C_1-C_6) アルコキシカルボニルピロリジン-1-イル；オキサゾリジン-3-イルまたは2(R)-ヒドロキシメチルピロリジン-1-イルであるか；または、 R_{10} は、3-および/または4-――または二―置換されたオキサゼチン-2-イル；2-、4-、および/または5-――置換または二―置換されたオキサゾリジン-3-イル；2-、4-、および/または5-――または二―置換されたチアゾリジン-3-イル；2-、4-、および/または5-――または二―

置換された1-オキソチアゾリジン-3-イル；2-，4-，および／または5-—または二置換された1，1-ジオキソチアゾリジン-3-イル；3-および／または4-，—または二置換されたピロリジン-1-イル；3-，4-および／または5-，—，二—または三置換されたペリリジン-1-イル；3-，4-，および／または5-—，二—または三置換されたピペラジン-1-イル；3-置換されたアゼチジン-1-イル；4-および／または5-，—または二置換された1，2-オキサジナン-2-イル；3-および／または4-—または二置換されたピラゾリジン-1-イル；4-および／または5-，—または二置換されたイソオキサゾリジン-2-イル；4-および／または5-，—および／または二置換されたイソチアゾリジン-2-イルであり；前記R₁₀置換基は、独立に、H；ハロ；(C₁-C₆)-アルキル；ヒドロキシ；アミノ，モノ-N—もしくはジ-N，N—(C₁-C₆)-アルキルアミノ；ホルミル；オキソ；ヒドロキシイミノ；(C₁-C₆)-アルコキシ；カルボキシ；カルバモイル；モノ-Nまたはジ-N，N—(C₁-C₄)-アルキルカルバモイル；(C₁-C₄)-アルコキシイミノ；(C₁-C₄)-アルコキシメトキシ；(C₁-C₆)-アルコキシカルボニル；カルボキシ(C₁-C₆)-アルキルまたはヒドロキシ(C₁-C₆)-アルキルであり；R₁₂は、H；メチル；エチル；n-プロピル；ヒドロキシ(C₁-C₆)-アルキル；(C₁-C₃)-アルコキシ(C₁-C₃)-アルキル；フェニル(C₁-C₄)-アルキル；フェニルヒドロキシ(C₁-C₄)-アルキル；(フェニル)(C₁-C₄)-アルコキシ(C₁-C₄)-アルキル；チエン-2-もしくは-3-イル(C₁-C₄)-アルキルまたはフル-2-もしくは-3-イル(C₁-C₄)-アルキルであり；前記R₁₂環は、炭素上を、H；ハロ；(C₁-C₄)-アルキル；(C₁-C₄)-アルコキシ；トリフルオロメチル；ヒドロキシ；アミノ；シアノまたは4，5-ジヒドロ-1H-イミダゾール-2-イルで、独立に、—，二—または三置換されているか；または、R₁₂は、ピリド-2-，-3-もしくは-4-イル(C₁-C₄)-アルキル；チアゾール-2-，-4-もしくは-5-イル(C₁-C₄)-アルキル；イミダゾール-2-，-4-もしくは-5-イル(C₁-C₄)-アルキル；ピロール-2-もしくは-3-イル(C₁-C₄)-アルキル；オキサゾール-2-，-4-もしくは-5-イル(C₁-C₄)-アルキル；ピラゾール-3-，-4-もしくは-5-イル(C₁-C₄)-アルキル；イソオキサゾール-3-，-4-もしくは-5-イル(C₁-C₄)-アルキル；イソチアゾール-3-，-4-もしくは-5-イル(C₁-C₄)-アルキル；ピリダジン-3-もしくは-4-イル(C₁-C₄)-アルキル；ビリミジン-2-，-4-，-5-もしくは-6-イル(C₁-C₄)-アルキル；ピラジン-2-もしくは-3-イル(C₁-C₄)-アルキル；1，3，

5-トリアジン-2-イル(C₁-C₄)-アルキルまたはインドール-2- (C₁-C₄)-アルキルであり；前記R₁₂ヘテロ環は、所望により、ハロ；トリフルオロメチル；(C₁-C₄)-アルキル；(C₁-C₄)-アルコキシ；アミノ；ヒドロキシまたはシアノで、独立に、—または二置換されており、前記置換基は、炭素に結合されているか；または、R₁₂は、R₁₁-カルボニルオキシメチルであり；前記R₁₁は、フェニル；チアゾリル；イミダゾリル；1H-インドリル；フリル；ピロリル；オキサゾリル；ピラゾリル；イソオキサゾリル；イゾアゾリル；ビリジル；ピリダジニル；ビリミジニル；ピラジニルまたは1，3，5-トリアジニルであり；前記R₁₁環は、所望により、ハロ；アミノ；ヒドロキシ；(C₁-C₄)-アルキル；(C₁-C₄)-アルコキシまたはトリフルオロメチルで、独立に、—または二置換されており、前記—または二置換基は、炭素に結合されており；R₁₃は、H；メチル；エチル；n-プロピル；ヒドロキシメチルまたはヒドロキシエチルであり；R₁₄C(O)R₁₅であり；R₁₅は、メルホリノ；チオメルホリノ；1-オキソチオメルホリノ；1，1-ジオキソチオメルホリノ；チアゾリジン-3-イル；1-オキソチアゾリジン-3-イル；1，1-ジオキソチアゾリジン-3-イル；ピロリジン-1-イル；ペリリジン-1-イル；ピペラジン-1-イル；ピペラジン-4-イル；アゼチジン-1-イル；1，2-オキサジナン-2-イル；ピラゾリジン-1-イル；イソオキサゾリジン-2-イル；イソチアゾリジン-2-イル；1，2-オキサアゼチジン-2-イル；オキサゾリジン-3-イル；3，4-ジヒドロキソキノリン-2-イル；1，3-ジヒドロイソインドール-2-イル；3，4-ジヒドロ-2H-キノリン-1-イル；2，3-ジヒドロベンゾ[1，4]オキサジン-4-イル；2，3-ジヒドロベンゾ[1，4]チアジン-4-イル；3，4-ジヒドロ-2H-キノキサリン-1-イル；3，4-ジヒドロベンゾ[c][1，2]オキサジン-1-イル；1，4-ジヒドロベンゾ[d][1，2]オキサジン-3-イル；3，4-ジヒドロベンゾ[e][1，2]オキサジン-2-イル；3H-ベンゾ[d]イソオキサゾール-2-イル；3H-ベンゾ[c]イソオキサゾール-1-イルまたはアゼパレン-1-イルであり；前記R₁₆環は、所望により、ハロ；(C₁-C₆)-アルキル；(C₁-C₆)-アルコキシ；ヒドロキシ；アミノ；モノ-N—もしくはジ-N，N—(C₁-C₆)-アルキルアミノ；ホルミル；カルボキシ；カルバモイル；モノ-N—もしくはジ-N，N—(C₁-C₆)-アルキルカルバモイル；(C₁-C₆)-アルコキシ(C₁-C₆)-アルコキシカルボニル；カルボニル；ベンジルオキシカルボニル；(C₁-C₆)-アルコキシカルボニル(C₁-C₆)-アルキル；(C₁-C₄)-アルコキシカルボニルアミノ；カルボキシ(C₁-C₆)-アルキル；カルバモイ

c. R_1 が、5-クロロであり； R_8 および R_9 が、Hであり； R_4 が、ベンジルであり； R_{10} が、イソオキサゾリジン-2-イルである；

d. R_1 が、5-クロロであり； R_8 および R_9 が、Hであり； R_4 が、ベンジルであり； R_{10} が、(1, 2)-オキサジナナン-2-イルである；

e. R_1 が、5-クロロであり； R_8 および R_9 が、Hであり； R_4 が、ベンジルであり； R_{10} が、3 (S)-ヒドロキシピロリジン-1-イルである；

f. R_1 が、5-クロロであり； R_8 および R_9 が、Hであり； R_4 が、ベンジルであり； R_{10} が、(3S, 4S)-ジヒドロキシピロリジン-1-イルである；

g. R_1 が、5-クロロであり； R_8 および R_9 が、Hであり； R_4 が、ベンジルであり； R_{10} が、cis-3, 4-ジヒドロキシピロリジン-1-イルである；および、

h. R_1 が、5-クロロであり； R_8 および R_9 が、Hであり； R_4 が、ベンジルであり； R_{10} が、モルホリノである；化合物が存在する。

【0014】式Iで表される好ましい化合物のもう1つの群は、 R_1 が、H；ハロ；メチルまたはシアノであり； R_8 および R_9 が、各々、独立に、Hまたはハロであり； A が、-C (H) = であり； R_2 および R_3 が、Hであり； R_4 が、フェニル (C_1-C_2) アルキルであり；前記フェニル基が、Hまたはハロで、独立に、-、-、二-または三-置換されているか、または、H；ハロ；(C_1-C_4) アルキル；(C_1-C_4) アルコキシ；トリフルオロメチル；ヒドロキシ；アミノまたはシアノで、独立に、-、-または二-置換されているか；または、 R_4 が、チエン-2-もしくは-3-イル (C_1-C_2) アルキル；ピリド-2-, -3-もしくは-4-イル (C_1-C_2) アルキル；チアゾール-2-, -4-もしくは-5-イル (C_1-C_2) アルキル；イミダゾール-1-, -2-, -4-もしくは-5-イル (C_1-C_2) アルキル；フル-2-もしくは-3-イル (C_1-C_2) アルキル；ピロール-2-もしくは-3-イル (C_1-C_2) アルキル；オキサゾール-2-, -4-もしくは-5-イル (C_1-C_2) アルキル；ピラゾール-3-, -4-もしくは-5-イル (C_1-C_2) アルキル；イミダゾール-1-, -2-, -4-もしくは-5-イル (C_1-C_2) アルキル；イソオキサゾール-3-, -4-もしくは-5-イル (C_1-C_2) アルキルであり；前記 R_4 ヘテロ環が、所望により、ハロ；トリフルオロメチル；(C_1-C_4) アルキル；(C_1-C_4) アルコキシ；アミノまたはヒドロキシで、独立に、-、-または二-置換され、前記-または二-置換基が炭素に結合されており； R_5 が、フッ素；(C_1-C_4) アルキル；(C_1-C_6) アルコキシ；アミノ (C_1-C_4) アルコキシ；モノ-N-もしくはジ-N-, N- (C_1-C_4) アルキルA- N (C_1-C_4) アルコキシ；カルボキシ (C_1-C_4) アルコキシ；(C_1-C_6) アルコキシ-カルボニル (C_1-C_4) アルコキシ；

ベンジルオキシカルボニル (C_1-C_4) アルコキシであり； R_7 が、H；フッ素または (C_1-C_6) アルキルである；化合物である。

【0015】式I Aで表される好ましい化合物の群は、 R_1 が、5-H；5-ハロ；5-メチル；5-シアノまたは5-トリフルオロメチルであり； R_8 および R_9 が、各々、独立に、Hまたはハロであり； A が、-C (H) = であり； R_2 および R_3 が、Hであり； R_{12} が、H；メチル；フェニル (C_1-C_2) アルキルであり；前記フェニル基が、H；ハロ；(C_1-C_4) アルキル；(C_1-C_4) アルコキシ；トリフルオロメチル；ヒドロキシ；アミノまたはシアノで、独立に、-、-または二-置換されており；前記 R_{12} 基は、所望により、ハロで、さらに-置換されているか；または、 R_{12} が、チエン-2-もしくは-3-イル (C_1-C_2) アルキル；ピリド-2-, -3-もしくは-4-イル (C_1-C_2) アルキル；チアゾール-2-, -4-もしくは-5-イル (C_1-C_2) アルキル；イミダゾール-2-, -4-もしくは-5-イル (C_1-C_2) アルキル；フル-2-もしくは-3-イル (C_1-C_2) アルキル；ピロール-2-もしくは-3-イル (C_1-C_2) アルキル；オキサゾール-2-, -4-もしくは-5-イル (C_1-C_2) アルキル；ピラゾール-3-, -4-もしくは-5-イル (C_1-C_2) アルキル；イソオキサゾール-3-, -4-もしくは-5-イル (C_1-C_2) アルキル；イソチアゾール-3-, -4-もしくは-5-イル (C_1-C_2) アルキル；ピリダジン-3-もしくは-4-イル (C_1-C_2) アルキル；ピリミジン-2-, -4-, -5-もしくは-6-イル (C_1-C_2) アルキル；ピラジン-2-もしくは-3-イル (C_1-C_2) アルキルまたは1, 3, 5-トリアジン-2-イル (C_1-C_2) アルキルであり；前記 R_{12} ヘテロ環が、所望により、ハロ；トリフルオロメチル；(C_1-C_4) アルキル；(C_1-C_4) アルコキシ；アミノまたはヒドロキシで、独立に、-、-または二-置換され、前記-または二-置換基が炭素に結合されており； R_{13} が、Hである；化合物からなる。

【0016】式I Aで表される好ましい化合物の上記群のうちには、 R_{12} が、H；フェニル (C_1-C_2) アルキル；チエン-2-もしくは-3-イル (C_1-C_2) アルキル；フル-2-もしくは-3-イル (C_1-C_2) アルキルであり；前記 R_{12} 環が、Hまたはフッ素で、独立に、-、-または二-置換されており； R_{16} が、モルホリノ；チオモルホリノ；1-オキソチオモルホリノ、1, 1-ジオキソチオモルホリノ；チアゾリジン-3-イル；1-オキソチアゾリジン-3-イル；1, 1-オキソチアゾリジン-3-イル；ピロリジン-1-イル；ピベラジン-1-イル；アゼチジン-1-イル；1, 2-オキサジナナン-2-イル；イソオキサジナナン-2-イル；イソオキサゾリジン-2-イル；イソチアゾリジン-2-イ

ル; 1, 2-オキササゼチジン-2-イル; オキサゾリジン-3-イル; 1, 3-ジヒドロイソインドル-2-イルまたはヘパゼン-1-イルであり; 前記 R_{16} 環が、所望により、ハロ; (C_1-C_6) アルキル; (C_1-C_6) アルコキシ; ヒドロキシ; アミ; モノ-N-もしくはジ-N, N- (C_1-C_6) アルキルアミノ; ホルミル; カルボキシ; カルバモイル; モノ-N-もしくはジ-N, N- (C_1-C_6) アルキルカルバモイル; (C_1-C_6) アルコシカルボニル; ヒドロキシ (C_1-C_6) アルキル; アミノ (C_1-C_6) アルキル; モノ-N-もしくはジ-N, N- (C_1-C_6) アルキルアミノ (C_1-C_6) アルキル; オキシ; ヒドロキシミノ-または (C_1-C_6) アルコキシミノ-の、独立に、一、二または三-置換されているが、ただし、 R_{16} はテトラ環類: チアゾリジン-3-イル; ピロリジン-1-イル; ペリリジン-1-イル; ピペラジン-1-イル; ピペラジン-4-イル; アゼチジン-1-イル; 1, 2-オキサジナン-2-イル; イソオキサゾリジン-2-イルまたはオキサゾリジン-3-イルのみが、所望により、オキシ; ヒドロキシミノまたは (C_1-C_6) アルコキシミノで-または二-置換されている; 前記 R_{16} 環が、所望により、さらに、 (C_1-C_6) アルキルで、独立に、一または二-置換されている; とりわけ好ましい化合物の群が存在する。

[10017] とりわけ好ましい化合物の上記群のうちに
 は、化合物：5-クロロ-1H-インドール-2-カル
 ボン酸 [(1S) -ベンジル-2- (3-ヒドロキシ
 ミノ-β-ピロリジン-1-イル)-2-オキソ-エチル]
 -アミド；5-クロロ-1H-インドール-2-カル
 ボン酸 [2- (cis-3, 4-ジヒドロキシβ-ピロリ
 ジン-1-イル)-2-オキソ-エチル] -アミド；5-
 クロロ-1H-インドール-2-カルボン酸 [2-
 ((3S, 4S) -ジヒドロキシβ-ピロリジン-1-
 イル)-2-オキソ-エチル] -アミド；5-クロロ-1
 H-インドール-2-カルボン酸 [(1S) -ベンジル
 -2- (cis-3, 4-ジヒドロキシβ-ピロリジン
 -1-イル)-2-オキソ-エチル] -アミド；5-クロ
 ロ-1H-インドール-2-カルボン酸 [2- (1, 1-
 ジオキソチアゾリジン-3-イル)-2-オキソ-
 エチル] -アミド；5-クロロ-1H-インドール-
 2-カルボン酸 (2-オキソ-2-チアゾリジン-3-
 イル-エチル) -アミド；5-クロロ-1H-インド
 ール-2-カルボン酸 [(1S) - (4-フルオロベン
 ジル)-2- (4-ヒドロキシβ-ピロリジン-1-
 イル)-2-オキソ-エチル] -アミド；5-クロ
 ロ-1H-インドール-2-カルボン酸 [(1S) -
 ベンジル-2- ((3RS) -ヒドロキシβ-ピロリ
 ジン-1-イル)-2-オキソ-エチル] -アミド；5-
 クロロ-1H-インドール-2-カルボン酸 [2- (1-
 RS) -オキソ-1-チアゾリジン-3-イル)-エチ

ル) アミド; 5-クロロ-1H-インドール-2-カルボン酸 [(1S) - (2-フルオロベンジル)-2-(4-ヒドロキシベンジル)-1-イル]-2-オキソ-エチル] アミド; 5-クロロ-1H-インドール-2-カルボン酸 [(1S) - ベンジル)-2-(3S, 4S)-3-ヒドロキシベンゾリジン-1-イル)-2-オキソ-エチル] アミド; 5-クロロ-1H-インドール-2-カルボン酸 [(1S) - ベンジル)-2-(3-ヒドロキシアゼチン-1-イル)-2-オキソ-エチル] アミド; 5-クロロ-1H-インドール-2-カルボン酸 [(1S) - ベンジル)-2-(4-ヒドロキシミノーペリジン-1-イル)-2-オキソ-エチル] アミド; および、5-クロロ-1H-インドール-2-カルボン酸 [1-ベンジル)-2-(3-ヒドロキシベンジル)-1-イル)-2-オキソ-エチル] アミドが存在する。

【0018】式I Aで表されるときわけ好ましい化合物の上記群のうちには、 R_{12} が、Hであり； R_1 が、チアゾリジン-3-イル；1-オキソチアゾリジン-3-イル；1, 1-ジオキソチアゾリジン-3-イルまたはオキサゾリジン-3-イルであるか、または、前記R₁₈置換基が、所望により、カルボキシ； (C_1-C_6) アルコキシカルボニル；ヒドロキシ (C_1-C_3) アルキル；アミノ (C_1-C_3) アルキル；モノ-N—もしくはジ-N, N— (C_1-C_3) アルキルアミノ (C_1-C_3) アルキルで、独立に、—または二—置換されているか；または、 R_{16} が、—または二—置換されたピロリジン-1-イルであり；前記置換基が、カルボキシ； (C_1-C_6) アルコキシカルボニル； (C_1-C_6) アルコキシ；ヒドロキシ；ヒドロキシ (C_1-C_3) アルキル；アミノ；アミノ (C_1-C_3) アルキル；モノ-N—もしくはジ-N, N— (C_1-C_3) アルキルアミノ (C_1-C_3) アルキルまたはモノ-N—もしくはジ-N, N— (C_1-C_3) アルキルアミノであり； R_{18} 置換が、所望により、さらに、 (C_1-C_6) アルキルで、独立に、二—置換されている；特に好ましい化合物群が存在する。

【0019】すぐ上の化合物群のうち的好ましい化合物は、

a. R_1 が、5-クロロであり; R_8 および R_9 が、Hであり; R_{15} が、cis-3, 4-ジヒドロキシピロリジン-1-イルである;

b. R_1 が、5-クロロであり; R_8 および R_9 が、Hであり; R_{15} が、(3S, 4S)-ジヒドロキシピロリジン-1-イルである;

c. R_1 が、5-クロロであり; R_8 および R_9 が、Hであり; R_{15} が、1, 1-ジオキソチアゾリジン-3-イルである;

d. R_1 が、5-クロロであり； R_8 および R_9 が、Hであり； R_{15} が、チアゾリジン-3-イルである；および、

e. R_1 が、5-クロロであり； R_8 および R_9 が、Hであり； R_{15} が、1-オキソチアゾリジン-3-イルである；化合物である。

【0020】式I Aで表されるとりわけ好ましい化合物の上記群のうちには、 R_{15} が、フェニルメチル；チエン-2-もしくは-3-イルメチルであり；前記 R_{15} 環が、所望により、フッ素で一または二置換されており； R_{15} が、チアゾリジン-3-イル；1-オキソチアゾリジン-3-イル；1, 1-ジオキソチアゾリジン-3-イルまたはオキサゾリジン-3-イルであるか、または、前記 R_{15} 置換基が、所望により、カルボキシ；(C_1-C_6) アルコキシカルボニル；ヒドロキシ(C_1-C_3) アルキル；アミノ(C_1-C_3) アルキル；または、モノ-N-もしくはジ-N, N-(C_1-C_6) アルキルアミノ(C_1-C_3) アルキルで、独立に、一または二置換されているか、または、 R_{15} は一一もしくは二置換されたアゼチジン-1-イルまたは一一もしくは二置換されたピロリジン-1-イルまたは一一もしくは二置換されたピペリジン-1-イルであり；前記置換基が、独立に、カルボキシ；(C_1-C_6) アルコキシカルボニル；ヒドロキシ(C_1-C_6) アルキル；アミノ(C_1-C_3) アルキル；モノ-N-もしくはジ-N, N-(C_1-C_6) アルキルアミノ；ヒドロキシ；(C_1-C_6) アルコキシ；アミノ；モノ-N-もしくはジ-N, N-(C_1-C_6) オキソ；ヒドロキシミノまたは(C_1-C_6) アルコキシミノであり； R_{15} 環は、所望により、さらに、(C_1-C_6) アルキルで、独立に、一または二置換されている；特に好ましい化合物のもう1つの群が存在する。

【0021】式I Aで表される特に好ましい化合物のすぐ上の群のうちの好ましい化合物は、

a. R_1 が、5-クロロであり； R_8 および R_9 が、Hであり； R_{12} が、4-フルオロベンジルであり； R_{15} が、4-ヒドロキシピペリジン-1-イルであり；炭素(a)の立体化学が、(S)である；

b. R_1 が、5-クロロであり； R_8 および R_9 が、Hであり； R_{12} が、ベンジルであり； R_{15} が、3-ヒドロキシピペリジン-1-イルであり；炭素(a)の立体化学が、(S)である；

c. R_1 が、5-クロロであり； R_8 および R_9 が、Hであり； R_{12} が、ベンジルであり； R_{15} が、cis-3, 4-ジヒドロキシピロリジン-1-イルであり；炭素(a)の立体化学が、(S)である；

d. R_1 が、5-クロロであり； R_8 および R_9 が、Hであり； R_{12} が、ベンジルであり； R_{15} が、3-ヒドロキシミノピロリジン-1-イルであり；炭素(a)の立体化学が、(S)である；

e. R_1 が、5-クロロであり； R_8 および R_9 が、Hであり； R_{12} が、フルオロベンジルであり； R_{15} が、4-ヒドロキシピペリジン-1-イルであり；炭素(a)の立体化学が、(S)である；

f. R_1 が、5-クロロであり； R_8 および R_9 が、Hであり； R_{12} が、ベンジルであり； R_{15} が、(3S, 4S)-ジヒドロキシピロリジン-1-イルであり；炭素(a)の立体化学が、(S)である；

g. R_1 が、5-クロロであり； R_8 および R_9 が、Hであり； R_{12} が、ベンジルであり； R_{15} が、3-ヒドロキシアゼチジン-1-イルであり；炭素(a)の立体化学が、(S)である；

h. R_1 が、5-クロロであり； R_8 および R_9 が、Hであり； R_{12} が、ベンジルであり； R_{15} が、3-ヒドロキシミノアゼチジン-1-イルであり；炭素(a)の立体化学が、(S)である；および、

i. R_1 が、5-クロロであり； R_8 および R_9 が、Hであり； R_{12} が、ベンジルであり； R_{15} が、4-ヒドロキシミノピペリジン-1-イルであり；炭素(a)の立体化学が、(S)である；化合物である。

【0022】式IまたはI Aで表されるグリコーゲンホスホリラーゼ阻害剤は、以下に挙げるような細菌性感染症および原生動物感染症ならびに病気を処置するために使用される：肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、ヘモフィラス・インフルエンザ(*Haemophilus influenzae*)、モラクセラ・カタリス(*Moraxella catarrhalis*)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)またはペプトストレプトコッカス・エスピーベ(*Peptostreptococcus spp.*)による感染に関連する肺炎、中耳炎、洞炎(*sinusitis*)、気管支炎疾患、扁桃炎；および、乳腺炎；化膿性球菌(*Streptococcus pyogenes*)、群CおよびG・ストレプトコッカス(*Croup C and G streptococci*)、クロストリジウム・ジフテリア(*Clostridium diphtheriae*)またはアクチノバシラス・ヘモリチカム(*Actinobacillus haemolyticum*)による感染に関連する咽頭炎、リウマチ熱および糸球体腎炎；肺炎菌(*Mycoplasma pneumoniae*)、レジオネラ・ニューモフィラ(*Legionella pneumophila*)、肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、ヘモフィラス・インフルエンザ(*Haemophilus influenzae*)またはクラミア・ニューモニア(*Chlamydia pneumoniae*)による感染に関連する気道感染症；黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、コアギュラーゼ陽性ブドウ球菌(*coagu*

lase-positive staphylococcus) [すなわち、エス・エプダーミディス (*S. epidermidis*)、エス・ヘリチカス (*S. hemolyticus*) 等]、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、ストレプトコッカス・アガラクチエ (*Streptococcus agalactiae*)、ストレプトコッカス群C-F (*Streptococcal groups C-F*) (微小コリネストレプトコッキー)、ビリダンス・ストレプトコッキー (*viridans streptococci*)、コリネバクテリウム・ミヌチシム (*Corynebacterium minutissimum*)、クロストリジウム・エスピービー (*Clostridium spp.*) またはバルトネラ・ヘンセラ (*Bartonella henselae*) による感染に関連する合併症のない皮膚および軟組織感染症；膿瘍および骨髄炎；および、出産熱；スタフィロコッカス・サプロフィチカス (*Staphylococcus saprophyticus*) またはエンテロコッカス・エスピービー (*Enterococcus spp.*) による感染に関連する合併症のない急性尿道感染症；尿道炎および子宮頸管炎；および、クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)、軟性下疳菌 (*Haemophilus ducreyi*)、トレポネマ・パルдум (*Treponema pallidum*)、ウレプラズマ・ウレアルチカム (*Ureplasma urealyticum*) または淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) による感染に関連するセックスにより伝染される病気；黄色ブドウ球菌 (食中毒および毒性ショック症候群) または群A、BおよびC ストレプトコッキー (*Group A, B, and C streptococci*) による感染に関連する毒性疾患；ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) による感染に関連する潰瘍；ボレリア・レキュレンチス (*Borrelia recurrentis*) による感染に関連する全身性発熱性症候群；ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*) による感染に関連するライム病；クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*)、肺炎球菌 (*S. pneumoniae*)、化膿球菌 (*S. pyogenes*) またはエイチ・インフルエンザによる感染に関連する結膜炎、角膜炎および涙囊炎；鳥型結核菌 (*Mycobacterium avium*) またはマイコバクテリウム・イントラセリウム (*Mycobacterium intracellulare*) による感染に関連する播種性の鳥型結核菌合併 (MAC) 病；カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter j*

ejuni) による感染に関連する胃腸炎；クリプトスポリジウム・エスピービー (*Cryptosporidium spp.*) による感染に関連する腸内原生動物；ビリダンス・ストレプトコッキー (*Viridans streptococci*) による感染に関連する歯牙感染症；ボルデテラ・ペルツシス (*Bordetella pertussis*) による感染に関連する持続性の咳き；クロストリジウム・ペルフリゲンシス (*Clostridium perfringens*) またはバクテロイデス・エスピービー (*Bacteroides spp.*) による感染に関連するガス壊疽；ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*)、クラミジア・ニューモニエ (*Chlamydia pneumoniae*) または肺炎菌 (*Mycoplasma pneumoniae*) による感染に関連するアテローム性動脈硬化症；志賀赤痢菌 (*Shigella dysenteriae*) による感染に関連する赤痢；ならびに、腸毒性イー・コリ (*enterotoxigenic E. coli*) または結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) による感染の症候群。動物において治療または予防することのできるこのような感染症に関連する細菌性感染症および原生動物感染症および病気としては、以下のものが挙げられる：パストレラ・ヘモリチカス (*Pasteurella haemolyticus*)、ピー・マルチダ (*P. multocida*)、マイコプラズマ・ボビス (*Mycoplasma bovis*) またはボルデテラ・エスピービー (*Bordetella spp.*) による感染に関連するウシ呼吸疾患；*E. coli* または原生動物 [すなわち、コシディア (*coccidia*)、クリプトスポリジウム (*Cryptosporidia*) 等] による感染に関連するウシ腸疾患；黄色ブドウ球菌 (*Staph. aureus*)、ストレプ・ウベリス (*Strep. uberis*)、ステレブ・アガラクチエ (*Strep. agalactiae*)、ストレプ・ジスガラクチエ (*Strep. dysgalactiae*)、クレブシエラ・エスピービー (*Klebsiella spp.*)、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) またはエンテロコッカス・エスピービー (*Enterococcus spp.*) による感染に関連する乳牛乳腺炎；アクチノバシラス・プロイロニューモニエ (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、ピー・マルチシディア (*P. multocida*) またはマイコプラズマ・エスピービー (*Mycoplasma spp.*) による感染に関連するブク呼吸疾患；*E. coli*、ローソニア・イントラセリウム (*Lawsonia intracellularis*)、サルモネラ (*Salmonella*) またはセリブリナ・ヒオディセンテリア (*Serpulina h*

yodysenteriae) による感染に関連するブタ腸炎; フソバクテリウム・エスピービー (Fusobacterium spp.) による感染に関連するウシ腐蹄病; E. coli による感染に関連するウシ子宮炎; フソバクテリウム・ネクロフォラム (Fusobacterium necrophorum) またはバクテロイデス・ノドス (Bacteroides nodosus) による感染に関連するウシの毛でおおわれたいぼ (cow hairy warts); 牛モラセラ菌 (Moraxella bovis) による感染に関連するウシ伝染性急性結膜炎; 原生動物 [すなわち、ネオスポリウム (neosporium)] による感染に関連するウシ未熟流産; E. coli による感染に関連する犬および猫における尿道感染症; 表皮ブドウ球菌 (Staph. epidermidis)、スタフ・インターミディウム (Staph. intermedium)、コアギュラーゼ・ネグ・スタフ (coagulase neg. Staph.) またはビー・ムルトンダ (P. multocida) による感染に関連する犬および猫における皮膚および柔軟組織感染症; および、アルカリゲネス・エスピービー (Alcaligenes spp.)、バクテロイデス・エスピービー (Bacteroides spp.)、クロストリジウム・エスピービー (Clostridium spp.)、エンテロバクター・エスピービー (Enterobacter spp.)、オイバクテリウム (Eubacterium)、ペプトストレプトコッカス (Peptostreptococcus)、ポルフィロモナス (Porphyromonas) またはプレボテラ (Prevotella) による感染に関連する犬および猫における歯および口の感染症。本発明は、また、菌血症、髄膜炎、胸膜腔腫、マラリア、眼オコセルカ症、トキソプラズマ症および心内膜炎の処置も包含する。本発明の方法に従い治療または予防することのできるような感染に関連するその他の細菌性感染症および原生動物性感染症ならびに病気については、J. P. Sanford et al., "The Sanford Guide To Antimicrobial Therapy," 26th Edition (Antimicrobial Therapy, Inc., 1996) を参照する。

【0023】1つの実施態様において、本発明に従い処置される感染症は、エネルギーおよび/または炭素供給源として、グリコーゲン; または、グリコーゲンの分解により生ずるグルコースを必要とする生物によって媒介される。

【0024】もう1つの実施態様において、グリコーゲンホスホリラーゼ阻害剤は、感染症に伴う、例えば、長期間の合併症を含め、合併症を軽減するのに十分なほど、感染症を軽減するかまたは排除する量投与される。

これら合併症としては、ぜん息および脳血管症が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0025】1つの別の実施例において、本発明は、細菌性感染症を処置するための医薬組成物であって、前記感染症を処置するために有効量の式IまたはI'で表される化合物を薬学的に許容可能な担体と組合せて含む医薬組成物に係る。

【0026】もう1つの実施態様において、クラミジアニューモニエ (Chlamydia pneumoniae) 感染症を処置するために、グリコーゲンホスホリラーゼ阻害剤が投与される。

【0027】本明細書で参考とする全ての特許、特許公報および参考文献は、ここで、参考とすることによって本明細書に組み込む。本明細書における個々の化合物を参考とすることは、これら化合物の薬学的に許容可能なアニオン性またはカチオン性塩類およびプロドラッグも、また、使用しうることを意味することを理解すべきである。

【0028】本明細書に記載するグリコーゲンホスホリラーゼ阻害剤を製造するための方法は、米国特許No. 5,952,322において、および、WO 96/39384およびWO 96/39385において、詳細に記載されている。

【0029】グリコーゲンホスホリラーゼ阻害剤という用語は、グリコーゲンホスホリラーゼの酵素作用を軽減、遅延またはなくする物質もしくは薬剤または物質および/または薬剤の組合せを称す。グリコーゲンホスホリラーゼの現在公知の酵素作用は、グリコーゲン巨大分子と無機リン酸塩とのグルコース-1-ホスフェートと本来のグリコーゲン巨大分子より1つ短いグルコシルであるグリコーゲン巨大分子への可逆反応 (グリコーゲノリシスの進行方向) を触媒することによるグリコーゲンの分解である。

【0030】本明細書で使用する“処置する (treating)”という用語は、予防的 (例えば、予防する) および軽減する処置を含む。ハロとは、塩素、臭素、ヨウ素またはフッ素を意味する。

【0031】アルキルとは、直鎖または分岐飽和炭化水素を意味する。このようなアルキル基の例としては (指示した長さが個々の例を包含すると仮定して)、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ヘキシルおよびイソヘキシルが挙げられる。

【0032】アルコキシとは、オキシを介して結合された直鎖または分岐飽和アルキルを意味する。このようなアルコキシの例としては (指示した長さが個々の例を包含すると仮定して)、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、tert-ブトキシ、ペントキシ、イソペントキシ、ヘキソキシおよびイソヘキソキシが挙げられる。

【0033】“薬学的に許容可能なアニオン性塩”という表現は、例えば、クロライド、ブロマイド、ヨウダイド、サルフェート、ビスアルフェート、ホスフェート、アセテート、マレエート、ピマレート、オキサレート、ラクテート、タートレート、シトレート、グルコネート、メタンサルホネートおよび4-トルエンスルホネートが挙げられ、これらに限定するものではないが、このようなアニオン類を含有する非毒性アニオン性塩類を称す。

【0034】“薬学的に許容可能なカチオン性塩”という表現は、例えば、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウムまたはプロトン化されたベンザチン、(N, N')-ジベンジルエチレンジアミン、コリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、メグラミン (N-メチル-グルカミン)、ペネタミン (N-ベンジルフェネチルアミン)、ピペラジンあるいはトキサミン (2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1, 3-プロパンジオール) が挙げられ、これらに限定するものではないが、このようなカチオン類を含有する非毒性カチオン性塩類を称す。

【0035】“プロドラッグ”という表現は、投与に続き、若干の化学的または生理学的プロセスを経て、インビボで薬剤を放出する薬剤前駆体である化合物を称す(例えば、生理学的pHに至らざるもと、プロドラッグは、所望される薬剤形へと転化される。)。プロドラッグの例としては、開裂の際に、対応する遊離酸を放出し、式IおよびIAで表される化合物のこのような加水分解可能なエステル形成残渣は、遊離の水素が、4-9個の炭素原子を有する(C₄-C₉)アルキル、(C₉-C₁₂)アルカノイルオキシメチル、1- (アルカノイルオキシ) エチル; 5-10個の炭素原子を有する1-メチル-1- (アルカノイルオキシ) -エチル; 3-6個の炭素原子を有するアルコキシカルボニルオキシメチル; 4-7個の炭素原子を有する1- (アルコキシカルボニルオキシ) エチル; 5-8個の炭素原子を有する1-メチル-1- (アルコキシカルボニルオキシ) エチル; 3-9個の炭素原子を有するN- (アルコキシカルボニル) アミノメチル; 4-10個の炭素原子を有する1- (N- (アルコキシカルボニル) アミノ) エチル; 3-フタリジル; 4-クロトノラクトニル; γ-ブチロラクトン-4-イル; ジ-N, N- (C₁-C₂) アルキルアミノ (C₂-C₃) アルキル (例えば、α-ジメチルアミノエチル); カルバモイル (C₁-C₂) アルキル; N, N-ジ (C₁-C₂) アルキルカルバモイル (C₁-C₂) アルキルおよびピペリジン、ピロリジンまたはモルホリン (C₂-C₃) アルキルによって置換されているカルボン酸置換基 (例えば、R₁₀が、カルボキシを含有する。) が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0036】その他のプロドラッグの例としては、ヒド

ロキシ置換基 (例えば、R₅が、ヒドロキシである。) の遊離の水素が、(C₁-C₆) アルカノイルオキシメチル; 1- ((C₁-C₆) アルカノイルオキシ) エチル; 1-メチル-1- ((C₁-C₆) アルカノイルオキシ) エチル; (C₁-C₆) アルコキシカルボニルオキシメチル; N- (C₁-C₆) アルコキシカルボニルアミノメチル; スクシノイル; (C₁-C₆) アルカノイル; α-アミノ (C₁-C₄) アルカノイル; アリールアクトールおよびα-アミノアセチル; または、α-アミノアシルによって置換されておき、前記α-アミノアシル部分が、独立に、蛋白質に存在する天然産のL-アミノ酸; P (O) (OH)₂; P (O) (O (C₁-C₆) アルキル)₂またはグリコシル (炭水化物のヘミアセタールのヒドロキシの脱離により生ずる基) のいずれかである、式IまたはIAで表されるアルコールを放出する。

【0037】その他のプロドラッグの例としては、R₂が、R-カルボニル; R'O-カルボニル; NRR' -カルボニルによって置換されている遊離の水素であり; RおよびR' は、各々、独立に、((C₁-C₁₀) アルキル; (C₃-C₇) シクロアルキル; ペンジルであるか; または、R-カルボニルは、天然のα-アミノアシルもしくは天然のα-アミノアシル-天然のα-アミノアシル; -C (OH) C (O) OY [ここで、Yは、H; (C₁-C₆) アルキルまたはベンジル; -C (OY)₂ Y₁ [ここで、Y₁は、(C₁-C₄) アルキルであり、Y₁は、(C₁-C₆) アルキル; カルボキシ (C₁-C₆) アルキル; アミノ (C₁-C₄) アルキル; または、モノ-N-もしくはジ-N, N- (C₁-C₆) アルキルアミノアルキルである。]; -C (Y₂) Y₃ [ここで、Y₂は、Hまたはメチルであり、Y₃は、モノ-もしくはジ-N, N- (C₁-C₆) アルキルアミノ; モルホリン; ピペリジン-1-イルまたはピロリジン-1-イルである。]である。]である、式IまたはIAで表される誘導体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0038】その他のプロドラッグの例としては、R₃に加水分解可能な部分を有し、これが、R₃が加水分解の際に遊離の水素である式IまたはIAで表される化合物を放出する式IまたはIAで表される誘導体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。R₃におけるこのような加水分解可能な部分としては、1-ヒドロキシ (C₁-C₆) アルキルまたは1-ヒドロキシ-1-フェニルメチルであり/が挙げられる。

【0039】その他のプロドラッグの例としては、R₂およびR₃が共通の炭素であり、かくして、5員環を形成する、式IまたはIAで表される化合物のような環状構造体が挙げられる。結合炭素は、H; (C₁-C₆) アルキル; (C₃-C₆) シクロアルキルまたはフェニルで、独立に、一または二置換されていてもよい。あるいは、R₃およびR₅は、互いに合さって、オキサゾリ

ジン環を形成してもよく、オキサソリジン環の数字の2の炭素は、H；(C₁-C₆) アルキル；(C₃-C₆) シクロアルキルまたはフェニルで、独立に、一または二置換されているもよい。

【0040】本発明に従い処置される哺乳動物としては、ヒトが挙げられるが、これに限定されるものではない。1つの実施態様において、哺乳動物は、ペット動物、例えば、犬または猫である。

【0041】当分野の化学者であれば、式IおよびIAで表されるある種の化合物は、個々の立体化学または幾何学的配置であってもよい1つ以上の原子を含有し、立体異性体および立体配置異性体を生ずる。このような原子の例は、式Iにおける(a)および(b)と標識された炭素原子；および、式IAにおける(a)と標識された炭素原子である。このような異性体およびその混合物は、全て、本発明の方法および組成物に含まれる。式IおよびIAで表される化合物の水和物も、また、含まれる。

【0042】式IおよびIAで表される化合物は、不斉炭素原子を有し、したがって、エナンチオマーまたはジアステレオマーである。ジアステレオマー混合物は、それらの物理的・化学的違いに基づき、それ自体公知の方法によって、例えば、クロマトグラフィーおよび/または分別結晶によってそれらの個々のジアステレオマーに分割することができる。エナンチオマーは、適当な光学活性化合物(例えば、アルコール)と反応させ、ジアステレオマーを分離し、個々のジアステレオマーを対応する純粋なエナンチオマーへと転化する(例えば、加水分解することによって、そのエナンチオマー混合物をジアステレオマー混合物へと転化させることにより分割)することができる。ジアステレオマー、エナンチオマーおよびそれらの混合物を含め、このような異性体は、全て、本発明の方法および組成物の一部と考えられる。式IおよびIAで表される化合物のいずれかの互変異性体の使用も、また、本発明によって包含される。

【0043】本発明で使用する多くの化合物は、生理学的条件でイオン化可能ではないが、本発明で使用する若干の化合物は、生理学的条件でイオン化可能である。かくして、例えば、本発明で使用する若干の化合物は、酸性であり、これらは、薬学的に許容可能なカチオンと塩を形成する。このような塩類は、全て、本発明の方法および組成物の範囲内であり、これらは、慣用的な方法によって製造することができる。例えば、これらは、酸性体および塩基性を、通常、化学量論比で、水性、非水性または一部水性媒体中で、適当に、単に接触させるだけで製造することができる。塩類は、濾過によるか、非溶剤で沈殿させ、続いて、濾過することによるか、溶剤を蒸発させることによるか、または、水溶液の場合には、凍結乾燥法によって、適当に回収することができる。

【0044】また、本発明で使用する若干の化合物は、塩基性であり、これらは、薬学的に許容可能なアニオンと塩を形成する。このような塩類は、全て、本発明の方法および組成物の範囲内にあり、これらは、慣用的な方法によって製造することができる。例えば、これらは、酸性体および塩基性を、通常、化学量論比で、水性、非水性または一部水性媒体中で、適当に、単に接触させるだけで製造することができる。塩類は、濾過によるか、非溶剤で沈殿させ、続いて、濾過することによるか、溶剤を蒸発させることによるか、または、水溶液の場合には、凍結乾燥法によって、適当に回収することができる。

【0045】また、式IまたはIAで表される化合物のいずれかの水和物または溶媒和物の使用も、また、本発明の範囲内に入る。グリコーゲンホスホリラーゼ阻害剤は、当業者であれば、標準検定に従い容易に決定される。

【0046】グリコーゲンホスホリラーゼを得る方法；および、グリコーゲンホスホリラーゼ阻害を測定するための検定を以下に記載する。その他のグリコーゲンホスホリラーゼ源およびグリコーゲンホスホリラーゼ阻害検定も、また、当分野で公知である。例えば、米国特許5,882,885のグリコーゲンホスホリラーゼもまた使用することができる。

【0047】病原体からグリコーゲンホスホリラーゼを精製、発現および検定する方法

細菌またはその他の病原体からグリコーゲンホスホリラーゼをクローニングおよび発現するための方法および方策は、分子生物学の分野で公知である。概して、プライマーは、所望されるグリコーゲンホスホリラーゼを包含するように設計される。所望されるグリコーゲンホスホリラーゼを含有する個々のPCR生成物は、増幅され、精製され、適当なプラスミドに挿入されて、調節促進剤(例えば、trpまたはlac)の制御下で、coli中で異種の蛋白質を発現させる。精製を簡単にするために、宿主細胞は、好ましくは、phoA、グリコーゲンホスホリラーゼの検定を妨害すること公知である内因性のホスホリラーゼを欠くものが使用される。酵素の精製は、Seok, et al., (Seok, et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:26511-26521)の方法によるか、または、精製において補助する標識(tags(例えば、his tagsまたは蛋白質融合体))を使用することによって達成される。種々の細菌からのグリコーゲンホスホリラーゼの検定は、反応条件の最適化、続く、酵素活性の精製を必要とするかもしれない。検定は、進行方向または逆方向で実施することができる(進行方向は、グリコーゲンまたはもう1つの基質からのグルコース-1-ホスフェートの生産をモニターし；逆反応は、無機リン酸塩の放出をモニターすることによってグルコース-

1-ホスフェートからのグリコーゲンの生成を測定する。))

一般的な抗細菌活性について化合物の活性を評価するためには、当業者であれば、National Committee for Clinical Laboratory Standards (Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically—4th Edition; Approved Standard, NCCLS document M7-A4 (ISBN 1-56236-309-4) 1997; Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria—3rd Edition; Approved Standards, NCCLS document M11-A3 (ISBN 1-56238-210-1) 1993) により開発されたガイドラインに従うことができるであろう。細胞内病原体に対する抗細菌活性を測定するための検定法は、各生物について公表されている文献に従い変わる。幾つかの具体的な例および詳細を以下に記載する。その他の生物に対する活性を測定するための試験は、当分野公知である。

【0048】鳥型結核菌 (*Mycobacterium avium*) を試験するための方法

寒天培地および肉汁希釈検定は、鳥型結核菌 (*Mycobacterium avium*) 複合体のインビトロ罹患性を測定するために実施することができる (Indrlied, C. B. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1987, 31:1697-1702)。ヒト単球で細胞内成長させつつ、*M. avium* の罹患性を測定するためには、(Bemudez, L. E., et al., により *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1996, 40:546-551 に記載されているようにして) 単球を入れた24穴組織培養プレートの各穴に、*M. avium* 細胞を十分に分散させた懸濁液 (最終濃度 $\sim 5 \times 10^7$ 細胞/mL) 100 μ L を加える。4時間後、マクロファージ内の *M. avium* 細胞/mL のベースラインを確立するために、溶解したマクロファージ単分子層の定量的なプレートカウントを実施する。ついで、種々の濃度で、感染させた単分子層を化合物で処置し；化合物および培地は、4日間毎日補充する。4日間の処置後、培地を取り除き、氷冷滅菌水を使用して単分子層を溶解させ、続いて、トデシル硫酸ナトリウムを含有する溶液を溶解させる。最終マクロファージ単分子層懸濁液を順次希釈し、Middlebrook 7H10 寒天培地上に二重にアリコート (0.1 ml) を置く。結果は、マクロ

ファージライセート 1 ml 当たりのコロニー形成ユニットの平均数として報告することができ、各検定は、三重に行う。MICは、99.9%の殺生を生ずる薬剤の最も低い濃度である。

【0049】レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*) を試験するための方法

96穴微量滴定トレー中、NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards 1990) ガイドラインに従いMICを行う。ヒト単球細胞系統 HL-60 (1.5×10^6 細胞/穴) に、レジオネラ・ニューモフィラ (*L. pneumophila*) の 1.5×10^7 コロニー形成ユニットを感染させる。6時間後、4回洗浄することによって、細胞外細菌を除き、化合物を種々の濃度で加える。48時間後、トリプシン-EDTA で除き、滅菌蒸留水で細胞を低張溶解し、続いて、順次希釈し、0.1%の α -ケトグルタレートを含む有する緩衝酵素キヌゼン寒天培地上でプレートカウントすることによって、2重穴から細胞に付随する細菌をカウントする (Stout, J. E. et al., *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 1998, 30:37-43)。MICは、99.9%の殺生を生ずる薬剤の最も低い濃度である。

【0050】トキソプラズマ・ゴンジー (*Toxoplasma gondii*) を試験するための方法

ペニシリン 100 U、1 ml 当たり 1 μ g のストレプトマイシンおよび10%の加熱不活性化させた *T. gondii* 抗体-陰性胎児ウシ血清を含有する Dulbecco の改良 Eagle 培地 (Gibco BRL, Grand Island, NY) 中で、ヒト包虫線維芽 (HFF) 細胞 (ATCC HS68) を成育する。インビトロ活性を *T. gondii* の細胞内再現を阻害する化合物の能力として定義し、 3 H ウラシル組込み技術によって測定する (Khan, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1996, 40:1855-1859)。つまり、プロトコールは、96穴底部平坦組織培養微量滴定プレート中、 10^4 細胞/穴で HFF 細胞を平板培養し、続いて、5%の CO_2 インキュベーター内 37℃ でインキュベーションすることからなる。交会後、単分子層にタキゾイトを3タキゾイト/細胞の比で感染させる。4時間後、単分子層を洗浄し、種々の濃度で化合物を加え、培養物を48時間インキュベートする。細胞を採取する4時間前に、 3 H ウラシル (1 μ Ci/細胞) を加え、その組込みレベルを測定する。細胞採取器で細胞を収集し、その放射活性をシンチレーションカウンターでカウントする。化合物は、それらの IC₅₀値、 3 H ウラシル組込み摂取および組込みの50

%を阻害する濃度によって比較する。

【0051】 クラモジア・ニューモニエ (Chlamydia Pneumoniae) に対する活性を試験するための方法を、以下、例において記載する。

哺乳動物源からのグリコーゲンホスホリラーゼ

グリコーゲンホスホリラーゼが活性化された“a”状態 (グリコーゲンホスホリラーゼa、または、略して、GPaと称す。) にあり、ここでは、ヒト肝臓グリコーゲンホスホリラーゼa (HLGPa)、ヒト筋肉グリコーゲンホスホリラーゼa (HMGPa) およびヒト脳グリコーゲンホスホリラーゼa (HBGPa) と称するが、ヒト源からの3つの異なる精製されたグリコーゲンホスホリラーゼ (GP) アイソエンザイムは、以下の方法によって得ることができる。

【0052】 発現および発酵

HLGPおよびHMGPa cDNAは、E. coli 菌株XL-1ブルー (Stratagene Cloning Systems, LaJolla, CA) 中のプラスミドpKK233-2 (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, New Jersey) から発現される。この菌株をLB培地 (10gのトリプトファン、5gの酵母エキス、5gのNaCl、および、1mlの1NのNaOH/リットルからなる。) プラス100mg/Lのアンプシリン、100mg/Lのピリドキシンおよび600mg/LのMnCl₂に接種し、37℃で細胞密度OD₅₅₀=1.0に育成させる。この時点で、細胞は、1mMのイソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトシド (IPTG) で誘発される。誘発後3時間で、遠心分離により細胞を採取し、精製が必要とされるまで、細胞ペレットを-70℃で凍結する。

【0053】 HBGPa cDNAは、数種の方法、例えば、Crerar, et al., (J. Biol. Chem. 270:13748-13756) によって記載されている方法によって発現させることがで

きる。HBGPの発現についてCrerar, et al. によって記載されている方法は、以下の通りである：HBGP cDNAは、E. coli 菌株25A6中のプラスミドpTACTACから発現させることができる。LB培地 (10gのトリプトファン、5gの酵母エキス、5gのNaCl、および、1mlの1NのNaOH/リットルからなる。) プラス50mg/Lのアンプシリンに菌株を接種し、一晩育成させ、ついで、新たなLB培地プラス50mg/Lのアンプシリンに再懸濁させ、250μMのイソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトシド (IPTG)、0.5mMのピリドキシンおよび3mM mg/Lを含有するLB/ampの40X体積に再接種し、22℃で48-50時間育成させる。ついで、遠心分離により細胞を採取することができ、精製が必要とされるまで、細胞ペレットを-70℃で凍結する。

【0054】 HLGPa cDNAは、Sf9細胞にBaculoGold Linear Viral DNA (Pharmingen, San Diego, CA) とともに共感染されたプラスミドpBlueBac111 (Invitrogen Corp., San Diego, CA) から発現される。組換えウイルスは、続いて、ブラーク-精製される。蛋白質を製造するために、血清を含まない培地中で育成されたSf9細胞は、0.5moiで、および、2×10⁶細胞/mlの細胞密度で感染させられる。27℃で72時間育成後、細胞は、遠心分離され、精製が必要とされるまで、細胞ペレットを-70℃で凍結する。

【0055】 E. coli で発現される哺乳動物グリコーゲンホスホリラーゼの精製

上記したペレット中のE. coli 細胞は、0.2mMのDTT、1mMのMgCl₂、プラス、以下の表aのプロテアーゼ阻害剤：

【0056】

【表1】

表a

0.7μg/mL	ペプスタチンA
0.5μg/mL	ロイペプチン
0.2mM	フェニルメチルホルポニルフルオリド (PMSF)；および、
0.5mM	EDTA

を、200μg/mLのソルファムおよび3μg/mLのDNAアーゼで前処理し、続いて、Branson Model 450 超音波細胞破壊器 (Branson Sonic Power Co., Danbury CT) を使用して250mLバッチ中氷上で5×1.5分間超音波処理することにより溶解させて含む25mMのβ-グリセロホスフェート (pH7) 中に再懸濁される。ついで、35,000×gで1時間遠心分離し、続いて、0.45μmのフィルターを介して濾過することにより、E. coli 細胞溶解物を透明とする。細胞溶解物の溶解成分中のGP (合計蛋白質の1%

未満であると評価される) は、(以下のGPa活性検定部分に記載するように) 酵素活性をモニターすることによって、以下に詳述する一連のクロマトグラフィー工程から精製される。

【0057】 固定化された金属アフィニティクロマトグラフィー (IMAC)

本工程は、Luong et al. (Luong et al. Journal of Chromatography (1992) 584, 77-84) の方法に基づく。細胞溶解物の濾過した溶解成分500mL (元の細胞ペレットのほぼ160-250gから調製

される)を、IMACキレーティングセファロース (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, New Jersey) の50mMのCuCl₂および25mMのβ-グリセロホスフェート、250mMのNaClおよび1mMのイミダゾールをpH7の平衡緩衝液で装填した130mLのカラムに負荷する。A₂₈₀がベースラインに戻るまで、平衡緩衝液でカラムを洗浄する。ついで、結合されたG Pおよびその他の結合された蛋白質を除去するために、100mMのイミダゾールを含有する同緩衝液でカラムから試料を溶離させる。G P活性を含有する画分をプールし(ほぼ600mL)、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、D、L-ジチオスレイトール(DT)、フェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)、ロイペプチンおよびペプスタチンAを加えて、0.3mM、0.2mM、0.2mM、0.5μg/mLおよび0.7μg/mL濃度を、それぞれ、達成する。25mMのTris塩酸塩(pH7.3)、3mMのDTT緩衝液(緩衝液A)で平衡としたSephadex G-25カラム(Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri)上で前記プールしたG Pを脱塩してイミダゾールを除き、第2のクロマトグラフィー工程まで、氷上で貯蔵する。

【0058】5'-AMP-セファロースクロマトグラフィー
脱塩されたG P試料(ほぼ600mL)は、次に、緩衝液A(上記参照。)で平衡とされている70mLの5'-AMP Sepharose (Pharmacia LKB Biototechnology, Piscataway, New Jersey)と

混合される。混合物を22℃で1時間緩やかに攪拌し、ついで、カラムに充填し、A₂₈₀がベースラインに戻るまで、緩衝液Aで洗浄する。25mMのTris-塩酸塩、0.2mMのDTTおよび10mMのアデノシン5'-モノホスフェート(AMP)で、pH7.3(緩衝液B)において、カラムからG Pおよびその他の蛋白質を溶離する。G P-含有画分をプールし、続いて、酵素(以下に記載)活性を測定し、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動、続いて、銀染色(2D-silver stain II "Daichi Pure Chemicals Co., Ltd., Tokyo, Japan)により、M_rをほぼ97kDa G P蛋白質バンドに視覚化することによって同定し、ついで、プールする。プールされたG Pは、25mMのβ-グリセロホスフェート、0.2mMのDTT、0.3mMのEDTA、200mMのNaCl、pH7.0緩衝液(緩衝液C)に透析し、使用するまで氷上で貯蔵する。

【0059】G P酵素の使用に先立ち、酵素は、E. coli菌株XL-1ブルー(GPbと称す)(Stratagene Cloning Systems, La Jolla, California)で発現される不活性化形から、以下のG Pの活性化部分に記載する方法により、活性化(GPaと称す)へと転化される。

【0060】Sf9細胞中で発現されたグリーゲンホスホリラーゼの精製
上記したベレット中のSf9細胞は、0.2mMのDTT、1mMのMgCl₂、プラス、以下の表bのプロテアーゼ阻害剤：

【0061】
【表2】

表b

0.7μg/mL	ペプスタチンA
0.5μg/mL	ロイペプチン
0.2mM	フェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)；および、
0.5mM	EDTA

を、3μg/mLのDNAアーゼで前処理し、続いて、Branson Model 450 超音波細胞破壊器(Branson Sonic Power Co., Danbury CT)を使用してバッチ内氷上で3×1分間超音波処理することにより溶解させて含む25mMのβ-グリセロホスフェート(pH7)中に再懸濁される。ついで、35,000×gで1時間遠心分離し、続いて、0.45ミクロンのフィルターを介して濾過することにより、Sf9細胞溶解物を透明とする。溶解物の溶解画分中のG P(合計蛋白質の1.5%であると評価される)は、(以下のGPa活性検定部分に記載するように)酵素活性をモニターすることによって、以下に詳述する一連のクロマトグラフィー工程から精製される。

【0062】固定化された金属アフィニティクロマトグラ

フィー(IMAC)
固定化された金属アフィニティクロマトグラフィーは、上記部分に記載したようにして行う。プールし、脱塩したG Pは、ついで、さらに処理されるまで、氷上で貯蔵される。

【0063】G Pの活性化
さらなるクロマトグラフィーの前に、Sf9細胞に発現された不活性化酵素(GPbと称す)の画分を、以下のG Pの活性化に記載する方法によって活性化へと転化する。

【0064】アニオン交換クロマトグラフィー
固定化されたホスホリラーゼキナーゼと反応させることによるIMAC精製GPbのGPaへの活性化に続き、プールしたGPa画分を、0.5mMのDTT、0.2mMのEDTA、1.0mMのフェニルメチルスルホニ

ルフルオライド (PMSF)、 $1.0 \mu\text{g/mL}$ のロイペプトンおよび $1.0 \mu\text{g/mL}$ のペプスタチン A を含有する 25 mM の Tris 塩酸塩、 $\text{pH} 7.5$ に対して透析する。ついで、Mono Q Anion Exchange Chromatography カラム (Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, New Jersey) 上に試料を負荷する。A₂₈₀ がベースラインに戻るまで、カラムを平衡緩衝液で洗浄する。ついで、カラムから、 $0-0.25 \text{ M}$ の NaCl 線形勾配で試料を溶離して、結合された GP およびその他の結合された蛋白質を取り出す。A₂₈₀ におけるピーク蛋白質吸光度について溶離液をモニターすることにより検出すると、GP 含有画分は、 $0.1-0.2 \text{ M}$ の NaCl 範囲で溶離する。ついで、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)、続いて、銀染色 (2D-silver Stain II "Daichi Kit", Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd., Tokyo, Japan) により、 M_r をほぼ 97 kDa の GP 蛋白質バンドに視覚化することによって同定し、ついで、ブールする。ブールした GP は、 25 mM の BES、 1.0 mM の DTT、 0.5 mM の EDTA、 5 mM の NaCl、 $\text{pH} 6.8$ 緩衝液へと透析し、使用するまで、氷上に貯蔵する。

【0065】GP 酵素活性の測定

GP の活性化 : GPb の GPa への転化
GP 酵素活性の測定前に、酵素は、E. coli 菌株 XL-1 ブルー (GPb と称す) (Stratagene Cloning Systems La Jolla, California) 中で発現された不活性形から、以下のように、ホスホリラーゼキナーゼを使用する GP のホスホリル化によって活性形 (GPa と称す) へと転化される。Sf 9 細胞中で発現された不活性酵素 (GPb と称す) の画分も、また、以下の方法により、活性形 (GPa と称す) へと転化される。

【0066】固定化されたホスホリラーゼキナーゼとの GP 反応

製造者の指示書に従い、ホスホリラーゼキナーゼ (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) を Affi-Gel 10 (Bio-rad Corp., Melville, NY) に固定化する。つまり、ホスホリラーゼキナーゼ酵素 (10 mg) は、 100 mM の HEPES および 80 mM の CaCl_2 の 2.5 mL 中、 $\text{pH} 7.4$ で 4°C で 4 時間洗浄した Affi-Gel 10 ベーズ (1 mL) でインキュベートする。ついで、 50 mM の HEPES および 1 M のグリシメチルエスデルでブロックする前に、 $\text{pH} 8.0$ で 1 時間室温で同緩衝液で Affi-Gel 10 ベーズを 1 回洗浄する。ブロック緩衝液を除く

し、 50 mM の HEPES ($\text{pH} 7.4$)、 1 mM の β -メルカプトエタノールおよび 0.2% の $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ を貯蔵のために置換する。使用する前に、GPb を GPa へと転化するために、 25 mM の β -グリセロホスフェート、 0.3 mM の DTT および 0.3 mM の EDTA、 $\text{pH} 7.8$ からなるキナーゼ反応を実施するために使用される緩衝液 (キナーゼ検定緩衝液) 中で洗浄することによって、Affi-Gel 10 固定化ホスホリラーゼキナーゼベーズを平衡とする。

【0067】上記 (E. coli から) $5'$ -AMP-セファロスクロマトグラフィーから得られる一部精製された不活性 GPb; または、上記 (Sf 9 細胞から) IMAC から得られる GPa と GPb と混合物をキナーゼ検定緩衝液で、 $1:10$ に希釈し、ついで、Affi-Gel 10 ベーズ上に固定化された前述のホスホリラーゼキナーゼ酵素と混合する。NaATP を 5 mM および MgCl_2 6 mM に加える。生ずる混合物を 25°C で $30-60$ 分間緩やかに混合する。ベーズから試料を取り出し、 3.3 mM の AMP の存在および不在における GP 酵素活性を測定することによって、GPa への転化による GPb のパーセント活性化を評価する。ついで、GPa 酵素活性 (AMP-独立) による合計 GP 酵素活性のパーセントを以下のようにして計算する:
(HLGP 活性 + AMP) / (HLGP 活性 + AMP) $\times 100$

あるいは、GPb の GPa への転化は、GPb の GPa への転化に従い表される電気泳動移動度におけるシフトに基づく等電点電気泳動によりモニターすることができる。プレキャストゲル [precast gels (pI 範囲 4-6.5)] および製造者の推奨する方法を使用する Pharmacia PlastGel System (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, New Jersey) を利用する等電点電気泳動 (IEF) により、GP 試料を分析する。ついで、分割された GPa および GPb バンドを銀染色 (2D-silver Stain II "Daichi Kit", Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd., Tokyo, Japan) によりゲル上に視覚化する。GPa および GPb の同定は、実験試料として同一ゲル上で平行して試験される E. coli 誘導 GPa および GPb 標準に対して比較することによりなされる。

【0068】GPa 活性検定

グリコーゲンホスホリラーゼの活性化された形 (GPa) に及ぼす式 I または II で表される化合物の効果は、2つの方法のうちの1つによって測定することができる; グリコーゲンホスホリラーゼ a 活性は、グリコーゲンからのグルコース-1-ホスフェートの生産をモニターすることによる進行方向において測定するか、または、逆反応に従い、無機ホスフェートの放出によるグル

コース-1-ホスフェートからのグリコーゲン合成を測定することによる。反応は、全て、96穴微量プレート中で3重に試験し、反応生成物の形成による吸光度の変化を、Titertech Microplate S tacker (ICN Biomedical Co. Hunstville, Alabama) に接続されたMCC/340 MKII Elisa Reader (Lab Systems, Finland) において以下に記載する波長で測定する。

【0069】進行方向におけるGPA酵素活性を測定するために、グリコーゲンからのグルコース-1-ホスフェートの生産は、以下のように改良されたPesce et al. (Pesce, M. A., Bodourian, S. H., Harris, R. C. and Nicholson, J. F. (1977) *Clinical Chemistry* 23, 1711-1717) の多酵素カップルさせた一般的な方法によってモニターされる: 1-100 μ g のGPA、10ユニットのホスホグルコミューターゼおよび15ユニットのグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN) を緩衝液A (以降に記載する) の1mLに希釈する。緩衝液Aは、pH7.2であり、50mMのHEPES、100mMのKCl、2.5mMのエチレンジアミン四酢酸 (EGTA)、2.5mMのMgCl₂、3.5mMのKH₂PO₄および0.5mMのジチオスレイトールを含有する。0.47mg/mLのグリコーゲン、9.4mMのグルコース、0.63mMのニコチンアミダデニジススクレオチドホスフェートの酸化された形 (NADPH+) を含有する80 μ Lの緩衝液Aに、このストック (stock) の20 μ Lを加える。試験される化合物は、酵素の添加前に、1.4%のジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液5 μ Lとして加えられる。阻害剤が存在しない場合のGPA酵素活性の基本的な速度は、1.4%DMSOの5 μ Lを加えることによって測定され、GPA酵素活性の完全に阻害された速度は、陽性コントロール試験物質、カフェイン50mMの20 μ Lを加えることにより得られる。反応は、室温で、酸化されたNADPH+の還元されたNADPHへの転化を340nmで測定することによって続けられる。

【0070】逆方向におけるGPA酵素活性を測定するためには、グルコース-1-ホスフェートのグリコーゲンプラス無機ホスフェートの転化が、以下のように改良

されたEngers et al. (Engers, H. D., Shechosky, S. and Madsen, N. B. (1970) *Can. J. Biochem.* 48, 746-754) によって記載された一般的な方法によって測定される: 1-100 μ gのGPAを緩衝液B (以降に記載する) の1mLに希釈する。緩衝液Bは、pH7.2であり、50mMのHEPES、100mMのKCl、2.5mMのEGTA、2.5mMのMgCl₂および0.5mMのジチオスレイトールを含有する。1.25mg/mLのグリコーゲン、9.4mMのグルコースおよび0.63mMのグルコース-1-ホスフェートを含む緩衝液Bの80 μ Lに、このストック20 μ Lを加える。試験する化合物を酵素の添加前に、1.4%のDMSO溶液5 μ Lとして加える。添加される阻害剤の存在なしでのGPA酵素活性の基本的な速度は、1.4%のDMSO5 μ Lを加えることによって測定し、GPA酵素活性の完全に阻害された速度は、50mMのカフェイン20 μ Lを加えることによって得られる。この混合物を室温で1時間インキュベートし、グルコース-1-ホスフェートから放出される無機ホスフェートを、以下のように改良されたLanzetta et al. (Lanzetta, P. A., Alvarez, L. J., Reinach, P. S. and Candia, O. A. (1979) *Anal. Biochem.* 100, 95-97) の一般法によって測定する: 10mg/mLのアンモニウムモリブデート、0.38mg/mLのマラカイトグリーンの1N HClの150 μ Lを酵素ミックスの100 μ Lに加える。室温で20分間インキュベーション後、吸光度を620nmで測定する。

【0071】上記検定は、また、種々の病原体源から誘導されるグリコーゲンホスホリラーゼの活性を評価するために使用することができる。必要とされる検定の適合は容易に達成される。

【0072】試験化合物によるGPA酵素活性のインビトロ阻害についてのIC₅₀値 (50%阻害に必要とされる試験化合物の濃度) を測定することが可能な試験化合物の濃度範囲で、上記検定を行った。

【0073】ヒト肝臓およびヒト筋肉グリコーゲンホスホリラーゼaアイソフォームに及ぼす本発明で使用される化合物の阻害効果を、以下、表1に示す。

【0074】

【表3】

表 1

化合物名	HLGPa IC ₅₀ nM	HMGP a IC ₅₀ nM
5-クロロ-1H-インドール-2-カルボン酸 〔(1S)-ベンジル-(2R)-ヒドロキシ- -(1,3S)-ヒドロキシ-ピロリジン-1-イル)-3-オキソプロピル〕-アミド	54	96
5-クロロ-1H-インドール-2-カルボン酸 〔(1S)-ベンジル-(2R)-ヒドロキシ- -(1,3S, 4S)-ジヒドロキシ-ピロリジン- 1-イル)-3-オキソプロピル〕-アミド	73	80
5-クロロ-1H-インドール-2-カルボン酸 〔(1S)-ベンジル-3-((3-ヒドロキシ- ゼチジン-1-イル)-(2R)-ヒドロキシ-3- オキソプロピル)-アミド	236	706
5-クロロ-1H-インドール-2-カルボン酸 〔(1S)-ベンジル-3-(cis-3,4-ジ ヒドロキシ-ピロリジン-1-イル)-(2R)- ヒドロキシ-3-オキソプロピル〕-アミド	69	385
5-クロロ-1H-インドール-2-カルボン酸 〔(1-ベンジル-2-(3-ヒドロキシ- ピロリジン-1-イル)-2-オキソ- エチル)-アミド	45	85
5-クロロ-1H-インドール-2-カルボン酸 〔(1S)-ベンジル-2-(cis-3,4-ジ ヒドロキシ-ピロリジン-1-イル)-2-オキソ- エチル〕-アミド	30	97
5-クロロ-1H-インドール-2-カルボン酸 〔(1S)-4-フルオロベンジル-2-(4- ヒドロキシ-ピロリジン-1-イル)-2-オキソ- エチル〕-アミド	142	68
5-クロロ-1H-インドール-2-カルボン酸 (2-オキソ-2-チアゾリジン-3-イル- エチル)-アミド	307	483
5-クロロ-1H-インドール-2-カルボン酸 〔(1S)-ベンジル-2-(3-ヒドロキシ- ゼチジン-1-イル)-2-オキソ-エチル〕-ア ミド	65	121

【0075】

【表4】

表 1 (続き)

化合物名	HLGPa IC ₅₀ nM	HMGP a IC ₅₀ nM
5-クロロ-1H-インドール-2-カルボン酸 〔(1S)-ベンジル-2-(3-ヒドロキシ ノ-アゼチジン-1-イル)-2-オキソ- エチル〕-アミド	65	84
5-クロロ-1H-インドール-2-カルボン酸 〔(1S)-ベンジル-2-(1,3S, 4S)-ジ ヒドロキシ-ピロリジン-1-イル)-2-オキソ- エチル〕-アミド	137	71

概して、グリコーゲンホスホリラーゼ阻害剤は、経口投与されるが、例えば、経口投与が不適切であるか、または、患者が薬剤を摂取することができない場合には、非経口投与（例えば、静脈内、筋肉内、皮下または髄内）も使用される。例えば、眼のようなある種の組織については、局所投与も、また、適している。

【0076】グリコーゲンホスホリラーゼ阻害剤は、単独；または、薬学的に許容可能な担体と組合せて、1回または多数回投与で投与することができる。適した薬学的担体としては、不活性な固体希釈剤もしくは充填剤、滅菌水溶液、オイル（例えば、ピーナツ油、ゴマ油）および種々の有機溶剤が挙げられる。活性化合物と薬学的に許容可能な担体とを組合せることによって形成される医薬組成物は、ついで、種々の剤形、例えば、錠剤、粉

末、ロゼンジ、乳化剤、オイルソフトゲル、シロップ、注射可能な溶液、噴霧乾燥配合物、経皮もしくは経粘膜パッチ、吸入可能な配合物等で容易に投与することができる。これら医薬組成物は、所望とあらば、さらなる成分、例えば、香味剤、結合剤、賦形剤等を含有してもよい。かくして、経口投与のためには、種々の賦形剤、例えば、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸カルシウムを含有する錠剤が、種々の崩壊剤、例えば、澱粉、メチルセルロース、アルギン酸およびある種の複合体シリケートとともに、結合剤、例えば、ポリビニルピロリドン、シュクロース、ゼラチンおよびアカシアと合わせて使用することができる。さらに、滑剤、例えば、ステアリン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウムおよびタルクも、錠剤化する目的のために有用なことが多

い。同タイプの固体組成物も、また、軟質および硬質充填ゼラチンカプセルとして使用することができる。このための好ましい物質としては、ラクトースもしくは乳糖および高分子量ポリエチレングリコール類が挙げられる。水性懸濁液またはエリキシルが経口投与のために所望される時、その中の必須活性成分は、種々の甘味剤もしくは香味剤、着色物質もしくは染料、および、所望される場合には、乳化剤もしくは懸濁剤とともに、希釈剤、例えば、水、エタノール、プロピレングリコール、グリセリンおよびこれらの組合せと組み合わせることができる。

【0077】非経口投与のためには、活性化合物またはその薬学的に許容可能な塩をゴマ油もしくはピーナツ油、水性プロピレングリコールまたは滅菌水溶液中含有する溶液を使用することができる。このような水性溶液は、必要とあらば、適当に緩衝化させる必要があり、最初に、液体希釈剤を十分なサリンまたはグルコースで等張とする。これらの個々の水性溶液は、静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内投与に特に適している。使用される滅菌水性媒体は、全て、当業者公知の標準技術によって容易に入手可能である。

【0078】ある一定量の活性成分で種々の医薬組成物を調製する方法は、公知であるか、または、当業者であれば、本開示に照らして明らかであろう。このような組成物を調製する方法の例については、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 19th Edition (1995)を参照する。

【0079】本発明に従い投与される医薬組成物は、概して、0.01%～95%のグリコーゲンホスホリラーゼ阻害剤、好ましくは、1%～70%のグリコーゲンホスホリラーゼ阻害剤を含有する。とにかく、投与されるべき組成物または配合物は、感染症を処置するために有効な量のグリコーゲンホスホリラーゼ阻害剤を含有する。典型的には、グリコーゲンホスホリラーゼ阻害剤についての有効な投量は、約0.005～50mg/kg/日の範囲内であり、好ましくは、0.01～25mg/kg/日の範囲内、最も好ましくは、0.1～15mg/kg/日の範囲内である。

【0080】本発明は、式Iで表される化合物を感染症を処置するための第2の化合物と組み合わせて投与することにより感染症を治療または予防することを含む。感染症を治療するための第2の化合物は、例えば、抗生物質、例えば、アミノグリコシド、ペニシリン、β-ラクタム阻害剤；抗結核剤、セファロsporin、カルバペネム、キノロン、マクロライド、ケトリド、オキサゾリジノン（すなわち、リネゾリド）、ストレプトグラミン類；抗-スタフィロコッカリ、リンコサミン、スルホンアミド；または、その他のタイプの抗生物質である。

このような抗生物質の例としては、アモキシシリン、アンピシリン、ボリシリン、アジスロマイシリン、アフロシリン、アズトレバム、バクテラシリン、バシトラシリン、ベネザミン、ベンザチン、ピシリン、ベンジルペニシリン、カブレオマイシリン、カルペニシリン、セフトロキサシム、セファマンドール、セファゾリン、セフィキシム、セフィゾキシム、セフラコール、セフメタゾール、セフォバゾン、セフォタキシム、セフォテタン、セフォキシチン、セフトアジウム、セフトリアクソン、セフロキサシム、セフアレキシム、セファロシン、セファピリン、セファラジン、クロラムベニコール、クロルテトラサイクリン、シラスタチン、シプロフロキサシン、クラリスロマイシン、クララン酸、クリンダマイシン、コリスチン、シクロセリン、ダルフォプリスチン、デメクロサイクリン、ジクロキサシリン、ドキシサイクリン、エリスロシン、エリスロマイシン、エタムブトール、エチオンアミド、 fosfomicin、ゲンタマイシン、イミベネム、イソニアジド、カナマイシン、リンコマイシン、リネゾリド、メロベネム、メタサイクリン、メチンアミン、マンデルアミン、メチシリン、メロニダゾール、メズロシリン、ミノサイクリン、ムピロシリン、ナフシリン、ナリジキ酸、ネオマイシン、ネチルミシン、ニトロフラントイン、ノフロキサシン、ノボピオシン、オフロキサシン、オキサシリン、オキソリ酸、オキシテトラサイクリン、キニプリシチン、パロモマイシン、ペフロキサシン、フェノキシメチルペニシリン、ピベラシリン、ボリミキシム、プロカインペニシリン、ピラジンアミド、γ-アミノサリチル酸、リファンピン、スペクチノマイシン、ストレプトマイシン、スルファサイチン、スルファイソキサゾール、スルバクタム、シネルシド、テリスロマイシン、スルファジアジン、スルファメチゾール、スルファメトキサゾール、スルファペリジン、スルファサラジン、スルフィソキサゾール、スルバクタム、テトラサイクリン、チエナマイシン、チカルシリン、トブラマイシン、トリメトプリム、トリスルファピリミジン類、トロバフロキシムおよびバンコマイシンが挙げられるが、これらに限定されるものではない。これら化合物の投与は、周知の用量決定および配合物を使用して行うことができる。

【0081】

【実施例】本発明は、以下の実施例によって例示されるが、これら実施例は、本発明の例を提供するものであり、本発明の範囲を狭くするものと理解してはならない。

【0082】実施例

クラミジアニューモニエ感染症を処置するためのG P阻害剤の使用

【0083】

【表5】

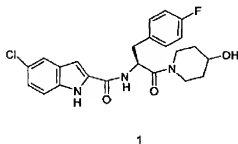
表 2

	プロトコール 1	プロトコール 2
化合物	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MBC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
1	12.5	25
2	25	25

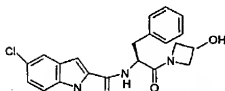
本実施例で使用される化合物を以下に示す。

【0084】

【化3】



1



プロトコール 1 は、96 穴底部平坦微量滴定プレートで実施した。5% CO₂ 中 37℃ で 24 時間インキュベートした標準培地に 10⁶ HEp-G2 細胞 / ml の 100 μL を各穴に入れた。化合物ストックは、ジメチルスルホキシド中で調製し、順次、2 倍希釈液に希釈し、100 μL のアリコートとして各穴に加えた。各化合物濃度を 3 重に検定した。基本小体 [クラミジアルストック (chlamydial stock)] を希釈して、1 ml 当たり 2 \times 10⁴ 細胞含有物形成ユニット (ifu) を含ませ、90 μL を各穴に加えた。感染を 5% CO₂ 中 37℃ で 72 時間進行させ、その後、細胞を固体化し、局反応性抗-LPS 抗体で染色した。蛍光 (FITC) 共役 2 次抗体の使用は、反転フルオロセッセントマ

イクロスコピーにより、細胞含有物含有細胞の数を同定可能とした。最小阻害濃度 (MIC) は、細胞含有物の形成を阻害する化合物の最低濃度と定義した。最小殺細菌濃度 (MBC) は、新たな培地を添加することにより化合物を取り出し、培養物をさらに 48 時間インキュベートした後、細胞含有物の形成を防止する化合物の最低濃度と定義した。クラミジア・ニューモニエ (*C. pneumoniae*) および HEp-G2 細胞の育成および調製は、Kalayoglu, M. V., et al., J. Infect. Dis., 1999, 780-790 に記載されている。直接フルオロセッセント抗体技術を使用する細胞含有物を検出するための方法は、Byrne, G. I., et al., J. Infect. Dis., 1993, 168: 415-420 に存在する。

【0085】プロトコール 2 は、HEp-G2 細胞をクラミジア・ニューモニエ (*C. pneumoniae*) で攻撃させた後 15 時間、化合物を加えた以外は、プロトコール 1 とほぼ同様であった。このプロトコールは、*C. pneumoniae* 育成および複製の後方段階で妨害する化合物を識別するのに補助する。

【0086】表 4 に示したように、化合物 1 および化合物 2 の両方とも、HEp-G2 細胞中の *C. pneumoniae* の育成に対して活性を示した。*pneumoniae* 育成および複製の後方段階で妨害するのに、化合物 1 が化合物 2 よりも優れていた。化合物 1 および化合物 2 の MIC は、HEp-G2 細胞をシクロヘキシミド (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で処置するプロトコールにおいて異ならなかったこともまた記載して置く。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
A61K 45/00		A61K 45/00	
A61P 31/00		A61P 31/00	
	31/04	31/04	
	31/10	31/10	
	31/12	31/12	
	43/00	43/00	111
C07D 403/12		C07D 403/12	
	413/12	413/12	
	417/12	417/12	

(72) 発明者 ジュディス・リー・トレッドウェイ
アメリカ合衆国コネチカット州06340, グ
ロトン, イースタン・ポイント・ロード,
ファイザー・グローバル・リサーチ・アン
ド・ディベロプメント